



УДК 616-092.6

DOI 10.17802/2306-1278-2025-14-5-103-121

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ПЕРВИЧНЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ КОРОНАРНОЙ И ВНУТРЕННЕЙ ГРУДНОЙ АРТЕРИИ ЧЕЛОВЕКА

В.Е. Маркова¹, Д.К. Шишкова¹, А.Д. Степанов¹, А.В. Фролов¹, М.Ю. Синицкий¹,
А.В. Синицкая¹, М.Р. Кабилов², А.Е. Тупикин², Ю.О. Юрьева¹, А.И. Лазебная¹,
А.Г. Кутихин¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», бульвар имени академика Л.С. Барбараша, стр. 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002; ² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, пр-кт академика Лаврентьева, 8, Новосибирск, Российская Федерация, 630090

Основные положения

- Первичные артериальные эндотелиальные клетки характеризуются экспрессией генов около 40 цитокинов, при этом экспрессия около 25 из них при провоспалительной дисфункции эндотелия повышается более чем в 1,5 раза.
- Несмотря на экспрессию первичными артериальными эндотелиальными клетками ряда молекул клеточной адгезии, не более пяти из них (включая VCAM1, ICAM1 и SELE) характеризуются $\geq 1,5$ -кратным повышением экспрессии при провоспалительной дисфункции эндотелия.
- ЭК-КА обладают более высокой базальной экспрессией ряда генов провоспалительных цитокинов в сравнении с ЭК-ВГА.

Цель

Провести сравнительный анализ экспрессии генов провоспалительных цитокинов и молекул клеточной адгезии в первичных эндотелиальных клетках коронарной артерии (ЭК-КА) и внутренней грудной артерии (ЭК-ВГА) человека для оценки провоспалительной активности ЭК из чувствительных и устойчивых к развитию атеросклероза артерий.

Материалы и методы

На основании предварительного дот-блот-профилирования был проведен анализ экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*MIF*, *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL1*, *CXCL5*, *CXCL10*, *PTX3*) и молекул клеточной адгезии (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*) методом ОТ-кПЦР. Далее был проведен расширенный анализ генов данных классов молекул по трем массивам данных полнотранскриптомного секвенирования.

Результаты

В ЭК-КА и ЭК-ВГА была выявлена экспрессия около 40 провоспалительных цитокинов. Наибольшей базальной экспрессией ($\text{TPM}_{\text{Ctrl}} > 2,5$) обладали 24 гена: *MIF*, *CCL2*, *PTX3*, *IL32*, *CXCL1*, *TGFB1*, *LTB*, *CXCL8*, *CSF1*, *CCL14*, *TGFB2*, *IL33*, *CXCL16*, *CXCL2*, *IL1A*, *CSF3*, *IL6*, *IL17D*, *CXCL3*, *CXCL6*, *IL12A*, *CXCL5*, *TGFB3* и *CXCL12*. Кроме того, 24 гена – *CSF2*, *CCL5*, *CCL20*, *CXCL5*, *CXCL8*, *CXCL3*, *CXCL11*, *IL1A*, *CXCL6*, *IFNE*, *CCL16*, *CXCL2*, *LTB*, *LTA*, *IL23A*, *CSF1*, *CXCL1*, *CXCL10*, *CSF3*, *IL6*, *IL32*, *TGFB1*, *CCL2* и *IL7* – характеризовались кратностью изменения экспрессии $\geq 1,50$ при провоспалительной дисфункции эндотелия. Из генов молекул клеточной адгезии лишь 3 (*VCAM1*, *ICAM1* и *SELE*) обладали кратностью изменения экспрессии > 2 и $\text{TPM}_{\text{Ctrl}} > 2,5$. В сравнении с ЭК-ВГА в ЭК-КА наблюдалась повышенная транскрипция провоспалительных генов (*MIF*, *IL6*, *CCL5*, *CSF3*, *CXCL1* и *SELP*), что указывало на их более высокую провоспалительную активность.

Заключение

Выделяемые из атерочувствительной артерии ЭК-КА характеризуются более высокой экспрессией провоспалительных генов по сравнению с выделяемыми из атерорезистентной артерии ЭК-ВГА, что объясняет склонность КА к развитию атеросклероза.

Для корреспонденции: Виктория Евгеньевна Маркова, marvika97@gmail.com; адрес: бульвар им. академика Л.С. Барбараша, стр. 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Corresponding author: Victoria E. Markova, marvika97@gmail.com; address: 6, Academician Barbarash blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

Ключевые слова Атеросклероз • Эндотелиальные клетки • Дисфункция эндотелия • Провоспалительные цитокины • Молекулы клеточной адгезии • Коронарная артерия • Внутренняя грудная артерия

Поступила в редакцию: 08.09.2025; поступила после доработки: 30.09.2025; принята к печати: 15.10.2025

EXPRESSION OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES
IN PRIMARY HUMAN CORONARY ARTERY AND INTERNAL THORACIC
ARTERY ENDOTHELIAL CELLS

V.E. Markova¹, D.K. Shishkova¹, A.D. Stepanov¹, A.V. Frolov¹, M.Yu. Sinitsky¹,
A.V. Sinitskaya¹, M.R. Kabilov², A.E. Tupikin², Yu.O. Yurieva¹, A.I. Lazebnaya¹,
A.G. Kutikhin¹

¹ Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, 6, Academician Barbarash blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002; ² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 8, Akademika Lavrentieva Ave., Novosibirsk, Russian Federation, 630090

Highlights

- Primary arterial endothelial cells show an expression of ≈ 40 cytokines, including ≈ 25 molecules overexpressed ≥ 1.5 -fold at pro-inflammatory endothelial dysfunction.
- Despite primary arterial endothelial cells expressed a variety of cell adhesion molecules, only ≈ 5 of them are overexpressed ≥ 1.5 -fold at pro-inflammatory endothelial dysfunction.
- Primary human coronary artery endothelial cells exhibit higher basal expression of pro-inflammatory cytokines in comparison with internal thoracic artery endothelial cells.

| | |
|------------|---|
| Aim | To compare expression of the genes encoding pro-inflammatory cytokines and cell adhesion molecules in primary human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) for the assessment of pro-inflammatory activation in the ECs isolated from atherosusceptible and atheroresistant arteries. |
| Methods | Following the dot blotting profiling, we quantified the expression of the genes encoding pro-inflammatory cytokines (<i>MIF</i> , <i>IL6</i> , <i>CXCL8</i> , <i>CCL2</i> , <i>CCL5</i> , <i>CCL20</i> , <i>CSF2</i> , <i>CSF3</i> , <i>CXCL1</i> , <i>CXCL5</i> , <i>CXCL10</i> , <i>PTX3</i>) and cell adhesion molecules (<i>VCAM1</i> , <i>ICAM1</i> , <i>SELE</i> , <i>SELP</i>) by RT-qPCR. We further performed an extended analysis of gene expression by interrogating three RNA sequencing datasets. |
| Results | We found ≈ 40 pro-inflammatory cytokines expressed in HCAEC and HITAEC. Baseline expression with $TPM_{Ctrl} > 2.5$ was detected for 24 genes: <i>MIF</i> , <i>CCL2</i> , <i>PTX3</i> , <i>IL32</i> , <i>CXCL1</i> , <i>TGFB1</i> , <i>LTB</i> , <i>CXCL8</i> , <i>CSF1</i> , <i>CCL14</i> , <i>TGFB2</i> , <i>IL33</i> , <i>CXCL16</i> , <i>CXCL2</i> , <i>IL1A</i> , <i>CSF3</i> , <i>IL6</i> , <i>IL17D</i> , <i>CXCL3</i> , <i>CXCL6</i> , <i>IL12A</i> , <i>CXCL5</i> , <i>TGFB3</i> , and <i>CXCL12</i> . In addition, 24 genes (<i>CSF2</i> , <i>CCL5</i> , <i>CCL20</i> , <i>CXCL5</i> , <i>CXCL8</i> , <i>CXCL3</i> , <i>CXCL11</i> , <i>IL1A</i> , <i>CXCL6</i> , <i>IFNE</i> , <i>CCL16</i> , <i>CXCL2</i> , <i>LTB</i> , <i>LTA</i> , <i>IL23A</i> , <i>CSF1</i> , <i>CXCL1</i> , <i>CXCL10</i> , <i>CSF3</i> , <i>IL6</i> , <i>IL32</i> , <i>TGFB1</i> , <i>CCL2</i> , and <i>IL7</i>) had fold change ≥ 1.50 in dysfunctional ECs as compared with the control ECs. Three genes encoding cell adhesion molecules (<i>VCAM1</i> , <i>ICAM1</i> , and <i>SELE</i>) had fold change > 2 and $TPM_{Ctrl} > 2.5$. In comparison with HITAEC, HCAEC had higher expression of pro-inflammatory genes (<i>MIF</i> , <i>IL6</i> , <i>CCL5</i> , <i>CSF3</i> , <i>CXCL1</i> , and <i>SELP</i>) indicating higher pro-inflammatory status. |
| Conclusion | HCAEC have higher expression of pro-inflammatory genes comparing to HITAEC, in concert with the higher atherosusceptibility of CA. |
| Keywords | Atherosclerosis • Endothelial cells • Endothelial dysfunction • Pro-inflammatory cytokines • Cell adhesion molecules • Coronary artery • Internal thoracic artery |

Received: 08.09.2025; received in revised form: 30.09.2025; accepted: 15.10.2025

Список сокращений

| | | | |
|---------|--|---------|---|
| ОТ-кПЦР | – количественная полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции | MCP-1/ | – фактор привлечения моноцитов |
| ЭК | – эндотелиальные клетки | CCL2 | |
| ЭК-ВГА | – эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии | MIF | – фактор ингибирования миграции макрофагов |
| ЭК-КА | – эндотелиальные клетки коронарной артерии | MIP-3α/ | – воспалительный белок макрофагов-3α |
| G-CSF | – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор | CCL20 | |
| GM-CSF | – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор | NOS3 | – эндотелиальная синтаза монооксида азота |
| IL | – интерлейкин | PTX3 | – пентраксин-3 |
| | | TPM | – количество транскриптов генов интереса на миллион прочтений |
| | | TSP-1 | – тромбоспондин-1 |
| | | vWF | – фактор фон Виллебранда |

Введение

Помимо обеспечения атромбогенности тока крови по сосудам, регуляции сосудистого тонуса и обеспечения газообмена [1], одной из основных функций эндотелиальных клеток (ЭК) является регуляция системного иммунитета за счет выделения провоспалительных цитокинов, в число которых входят фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-8 (IL-8/CXCL8), фактор привлечения моноцитов (MCP-1/CCL2), воспалительный белок макрофагов-3α (MIP-3α/CCL20), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), хемокины RANTES/CCL5, GROα/CXCL1, ENA-78/CXCL5 и IP-10/CXCL10, а также пентраксин-3 (PTX3) [2]. Данные цитокины выделяются различными линиями ЭК клапанов сердца и кровеносных сосудов независимо от их происхождения, в норме обеспечивая необходимый уровень реактивности организма на развитие инфекции, а также поддерживая способность ЭК реагировать на нарушения гомеостаза сосудистой стенки [3]. Предполагается, что выделение ЭК ограниченного спектра и относительно невысокого количества провоспалительных цитокинов в системный кровоток представляет собой эволюционный механизм защиты организма от патологических последствий транзиторной бактериемии и паразитарных инвазий [4]. При развитии различных патологических состояний (гиперлипидемии, гипергликемии, гиперфосфатемии, уремии, ишемии), новой коронавирусной инфекции (COVID-19) или сепсисе различной этиологии происходит избыточная провоспалительная активация эндотелия, также называемая его дисфункцией. Помимо патологического повышения выделения провоспалительных цитокинов, дисфункция эндотелия также может сопровождаться повышением выделения в системный кровоток обладающих протромботическим действием фактора фон Виллебранда (vWF) и тромбоспондина-1 (TSP-1) [5], отражающей повышенный риск тромбоза растворимой фор-

мы рецептора урокиназы (suPAR) [6], растворимых форм эндотелиальных мембранных рецепторов (CD106/VCAM-1, CD146/MCAM, CD147/басигина, CD202b/TIE-2/ТЕК и CD306/KDR/VEGFR2) [7], мембранных рецепторов защиты от комплемента (CD59 и CD55) [8] и компонентов эндотелиального гликокаликса (CD138/синдекан-1, HSPG1/синдекан-2, синдекан-4, ESM1/эндокан, гиалуриновая кислота, тромбомодулин) [9].

Ранее в наших исследованиях была показана повышенная провоспалительная активность ЭК внутренней грудной артерии (ЭК-ВГА) в сравнении с ЭК аортального клапана сердца (ЭК-АК), большой подкожной вены (ЭК-БПВ) и сосудов микроциркуляторного русла подкожной жировой ткани (МСЭК) [10]. Также было показано, что наиболее экспрессируемыми в ЭК генами цитокинов являются *MIF* (кодирующий фактор ингибирования миграции макрофагов), *CCL2* (кодирующий фактор привлечения моноцитов MCP-1), *CXCL8* (кодирующий интерлейкин-8), *CXCL1* (кодирующий хемокин GROα/CXCL1) и *PTX3* (кодирующий пентраксин-3). В то же время остается актуальным вопрос сравнительного анализа провоспалительной активности ЭК различных артерий – к примеру, ЭК часто поражаемой атеросклерозом коронарной артерии (ЭК-КА) и ЭК-ВГА. Иерархия экспрессии генов провоспалительных цитокинов в ЭК-КА ранее также показана не была.

Целью данного исследования было провести сравнительный анализ экспрессии генов провоспалительных цитокинов и молекул клеточной адгезии в ЭК-КА и ЭК-ВГА для оценки провоспалительной активности ЭК из чувствительных и устойчивых к развитию артерий. На первом этапе работы посредством дот-блоттинга был проведен предварительный скрининг провоспалительных молекул, выделяемых в культуральную среду ЭК-КА и ЭК-ВГА. Далее при помощи количественной полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции (ОТ-кПЦР) был проведен анализ экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*MIF*, *IL6*, *CXCL8*,

CCL2, CCL5, CCL20, CSF2, CSF3, CXCL1, CXCL5, CXCL10, PTX3), молекул клеточной адгезии – рецепторов эндотелиальных клеток для лейкоцитов (*VCAM1, ICAM1, SELE, SELP*), транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода (*SNAI1, SNAI2, TWIST1, ZEB1*), эндотелиальной синтазы монооксида азота (*NOS3*) и фактора фон Виллебранда (*VWF*) в ЭК-КА и ЭК-ВГА из двух независимых экспериментов. Выраженность экспрессии генов провоспалительных цитокинов и генов молекул клеточной адгезии была также независимо оценена в трех массивах данных полнотранскриптомного секвенирования ЭК-КА.

Материалы и методы

Культивирование эндотелиальных клеток и выделение РНК

Для двух независимых экспериментов с ЭК использовали коммерческие культуры первичных ЭК атерочувствительной коронарной артерии человека (HCAEC или ЭК-КА, 300K-05a, Cell Applications) и первичных ЭК атерорезистентной внутренней грудной артерии человека (HITAEC или ЭК-ВГА, 308K-05a, Cell Applications). Все эксперименты проводили параллельно на обеих линиях ЭК. Согласно информации поставщика, первичные ЭК человека были получены из здоровых артерий доноров с криоконсервацией на втором пассаже (500,000 клеток на виалу). Для проведения экспериментов ЭК размораживали и культивировали во флаконах T-75 (N-708003, Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd.) в среде для устойчивой пролиферации ЭК EndoBoost (EB1, AppScience Products). После двух пассажей ЭК рассевали в 6-луночные планшеты (N-703001, Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd.) и культивировали до достижения конfluence. Пассажи́рование (пересев) ЭК осуществляли с использованием 0,25% раствора трипсина и этилендиаминтетрауксусной кислоты (трипсин-ЭДТА, П043п, ПанЭко) и 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS-НП-11A, Capricorn Scientific) для ингибирования трипсина. Непосредственно перед проведением экспериментов сывороточную среду EndoBoost заменяли на бессывороточную среду для поддержания физиологического состояния ЭК EndoLife (EL1, AppScience Products) с промежуточным двукратным промыванием ЭК фосфатно-солевым буфером по Дульбекко (DPBS или ФСБД, здесь и далее – без кальция и магния, 1.2.4.7., БиоЛот) для отмычки от остаточных компонентов фетальной бычьей сыворотки во избежание неспецифической кросс-реакции с бычьими антигенами при дот-блоттинге. Дисфункцию эндотелия индуцировали посредством воздействия кальципротеиновых частиц (25 мкг кальция на 1 мл культуральной среды) или митомицина C (500 нг/мл) в соответствии с описанными ранее в статьях нашей группы протоколами [11, 12]. После

24-часовой инкубации культуральную среду отбрасывали, центрифугировали при $2\,000 \times g$ для осаждения клеточного дебриса (MiniSpin Plus, Eppendorf), переносили в новые микропробирки с низким связыванием белка (Ac-ACT-017-L-B-S, Accumax Lab Devices) и замораживали при -80°C для последующей оценки содержания цитокинов при помощи дот-блоттинга. Культуры ЭК промывали холодным раствором ФСБД (4°C) и лизировали тризолом (15596018, Thermo Fisher Scientific) для выделения РНК в соответствии с инструкцией производителя.

Анализ содержания цитокинов в культуральной среде

Полуколичественное измерение уровня цитокинов, выделяемых ЭК-КА и ЭК-ВГА в культуральную среду, проводили посредством дот-блоттинга. Для повышения концентрации цитокинов в культуральной среде выполняли обогащение бессывороточной среды EndoLife до равных объемов (в 6 раз, с 6 мл до 1 мл) при помощи вакуумного центрифужного концентрирования (HyperVAC-LITE, Gyrozen Co. Ltd.). Скрининговый полуколичественный анализ содержания цитокинов, выделяемых ЭК-КА и ЭК-ВГА в культуральную среду, выполняли с использованием наборов для дот-блот профилирования Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit (ARY022B, R&D Systems) в соответствии с инструкциями производителя (1 мл обогащенной культуральной среды на образец). Хемилюминесцентную детекцию результатов дот-блоттинга проводили при помощи системы визуализации Odyssey XF (LI-COR Biosciences). Денситометрический анализ хемилюминесцентной съемки результатов дот-блоттинга выполняли в программе ImageJ (версия 1.54k, National Institutes of Health). Использование бессывороточной среды позволяло отмыть остаточные компоненты фетальной бычьей сыворотки и избежать неспецифической кросс-реакции с бычьими антигенами.

Анализ генной экспрессии

Обратную транскрипцию РНК, выделенной в каждом из двух независимых экспериментов, выполняли с использованием набора для синтеза кДНК M-MuLV-RH First Strand cDNA Synthesis Kit (R01-250, Евроген) и обратной транскриптазы M-MuLV-RH (R03-50, Евроген). Измерение генной экспрессии проводили при помощи ОТ-кПЦР с использованием самостоятельно разработанных праймеров (500 нмоль/л каждый, Евроген), кДНК (20 нг) и мастер-микса BioMaster HS-qPCR Lo-ROX SYBR (MHR031-2040, Биоллабмикс) в соответствии с инструкциями производителя. Для каждой биологической повторности ($n = 18$, по числу лунок в эксперименте) при измерении уровня генной экспрессии выполняли три технических повторности.

Количественный анализ уровней мРНК в лизате ЭК человека (гены провоспалительных цитокинов: *MIF*, *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL1*, *CXCL5*, *CXCL10*, *PTX3*, гены рецепторов эндотелиальных клеток для лейкоцитов: *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*, гены транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода: *SNAIL*, *SNAI2*, *TWIST1*, *ZEB1*, гены эндотелиального фенотипа: *NOS3* и *VWF* проводили с использованием метода 2^{-ΔΔCt}, пересчитывая уровни транскриптов генов интереса относительно экспрессии референсных генов (*ACTB*, *GAPDH* и *B2M* в первом эксперименте; *PECAM1* во втором эксперименте) и относительно группы сравнения (ЭК-КА). Используемые в исследовании пары праймеров представлены в табл. 1.

Полнотранскриптомное секвенирование

Для полнотранскриптомного секвенирования (RNA-seq) использовали ЭК-КА (в трех независимых экспериментах) в количестве 1,000,000

клеток для каждой культуры. После достижения конфлюэнтности клетки лизировали тризолом (15596018, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) с последующим выделением РНК при помощи набора Purelink RNA Micro Scale Kit (12183016, Invitrogen) с сопутствующей обработкой ДНКазой (DNASE70, Sigma-Aldrich). Контроль качества РНК осуществляли с помощью набора RNA 6000 Pico Kit (5067–1513, Agilent) на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent) по индексу целостности РНК (RNA integrity number, RIN). Оценку количества выделенной РНК проводили на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) и флуориметре Qubit 4 (Invitrogen). Для 1 мкг выделенной РНК проводили деплецию рРНК посредством набора RiboCop rRNA Depletion Kit V1.2 (037.96, Lexogen) с дальнейшим конструированием ДНК-библиотек при помощи набора SENSE Total RNA-Seq Library Prep Kit (042.96). Для каждого образца РНК использовали определенный баркод. Качество полученных ДНК-библиотек анализировали с помощью набора High

| Таблица 1. Последовательности праймеров для количественной полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции | | |
|--|--------------------------------|-----------------------------------|
| Table 1. Primer sequences for reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction | | |
| Ген / Gene | Прямой праймер / Direct primer | Обратный праймер / Reverse primer |
| Провоспалительные цитокины / Pro-inflammatory cytokines | | |
| <i>MIF</i> | 5'-GGTGTCCGAGAAGTCAGGCA-3' | 5'-GGGGCACGTTGGTGTTTACG-3' |
| <i>IL6</i> | 5'-GGCACTGGCAGAAAACAACC-3' | 5'-GCAAGTCTCCTCATTGAATCC-3' |
| <i>CXCL8</i> | 5'-CAGAGACAGCAGAGCACAC-3' | 5'-AGTTCTTTAGCACTCCTTGGC-3' |
| <i>CCL2</i> | 5'-TTCTGTGCCTGCTGCTCATAG-3' | 5'-AGGTGACTGGGGCATTGATTG-3' |
| <i>CCL5</i> | 5'-AGTGGCAAGTGCTCCAACCC-3' | 5'-TCAGCCGGGAGTCATACAGGA-3' |
| <i>CCL20</i> | 5'-TGAAGGCTGTGACATCAATGCT-3' | 5'-CCATTCCAGAAAAGCCACAGTT-3' |
| <i>CSF2</i> | 5'-AGCCTCACCAAGCTCAAGGG-3' | 5'-GGGGATGACAAGCAGAAAGTCC-3' |
| <i>CSF3</i> | 5'-TCCAGGAGAAGCTGGTGAGTGA-3' | 5'-GAGCCCCTGGTAGAGGAAAAGG-3' |
| <i>CXCL1</i> | 5'-GCTTGCCTCAATCCTGCATCC-3' | 5'-ACAATCCAGGTGGCCTCTGC-3' |
| <i>CXCL5</i> | 5'-ATCTGCAAGTGTTGCCCATAGG-3' | 5'-TCCATGCGTGTCTATTCTCTT-3' |
| <i>CXCL10</i> | 5'-AGGAACCTCCAGTCTCAGCAC-3' | 5'-GGACAAAATTGGCTTGCAAGGA-3' |
| <i>PTX3</i> | 5'-GAACTTTGCGTCTCTCCAGCAA-3' | 5'-AGAGCTTGTTCCATTCCGAGT-3' |
| Молекулы клеточной адгезии (рецепторы эндотелиальных клеток для лейкоцитов) / Cell adhesion molecules (endothelial cell receptors for leukocytes) | | |
| <i>VCAM1</i> | 5'-CGTCTTGGTCAGCCCTTCCT-3' | 5'-ACATTCAATACTCCCGCATCCTTC-3' |
| <i>ICAM1</i> | 5'-TTGGGCATAGAGACCCCGTT-3' | 5'-GCACATTGCTCAGTTCATACACC-3' |
| <i>SELE</i> | 5'-GCACAGCCTTGTCACCAACC-3' | 5'-ACCTACCAAACCCTTCG-3' |
| <i>SELP</i> | 5'-ATGGGTGGGAACCAAAAAGG-3' | 5'-GGCTGACGGACTCTTGATGTAT-3' |
| Транскрипционные факторы эндотелиально-мезенхимального перехода / Endothelial-to-mesenchymal transition transcription factors | | |
| <i>SNAIL</i> | 5'-CAGACCCACTCAGATGTCAAGAA-3' | 5'-GGGCAGGTATGGAGAGGAAGA-3' |
| <i>SNAI2</i> | 5'-ACTCCGAAGCCAAATGACAA-3' | 5'-CTCTCTCTGTGGGTGTGTGT-3' |
| <i>TWIST1</i> | 5'-GTCCGCAGTCTTACGAGGAG-3' | 5'-GCTTGAGGGTCTGAATCTTGCT-3' |
| <i>ZEB1</i> | 5'-GATGATGAATGCGAGTCAGATGC-3' | 5'-ACAGCAGTGTCTTGTTGTTGT-3' |
| Маркеры эндотелиального фенотипа / Endothelial phenotype genes | | |
| <i>NOS3</i> | 5'-GTGATGGCGAAGCGAGTGAAG-3' | 5'-CCGAGCCCGAACACACAGAAC-3' |
| <i>VWF</i> | 5'-CCTTGACCTCGGACCCCTATG-3' | 5'-GATGCCCGTTACACCACT-3' |
| Гены «домашнего хозяйства» / Housekeeping genes | | |
| <i>ACTB</i> | 5'-CATCGAGCACGGCATCGTCA-3' | 5'-TAGCACAGCCTGGACAGCAAC-3' |
| <i>GAPDH</i> | 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3' | 5'-GCCCAATACGACCAAAATCC-3' |
| <i>B2M</i> | 5'-TCCATCCGACATTGAAGTTG-3' | 5'-CGGCAGGCATACTCATCTT-3' |

Sensitivity DNA Kit (5067-4626, Agilent) на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent). Концентрацию ДНК-библиотек определяли с помощью количественной полимеразной цепной реакции с детекцией результата в реальном времени на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad). Далее ДНК-библиотеки смешивали эквимольно и секвенировались на платформе HiSeq 2000 (Illumina) с длиной парно-концевых прочтений 2×125 нуклеотидов. Полученные прочтения фильтровали по качеству ($QV > 20$), длине (> 20) и удаляли адаптерные последовательности с помощью программы TrimGalore v.0.4.4 (Babraham Bioinformatics). После фильтрации среднее количество прочтений превышало 10 млн. Картирование прочтений на геном человека (hg38) с аннотацией Ensembl (v.38.93) проводилось с использованием программы CLC GW 11.0 (Qiagen) со следующими параметрами: Similarity fraction = 0,8, Length fraction = 0,8, Mismatch cost = 2, Insertion cost = 3, Deletion cost = 3. Биоинформатический анализ проводили с использованием следующих метрик: кратность изменения экспрессии (fold change), количество транскриптов генов интереса на миллион прочтений при базальной активности (то есть в контрольной группе, TPM_{Ctrl}) и при дисфункции эндотелия (TPM_{Dysf}).

Статистический анализ

Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). При анализе результатов ОТ-кПЦР данные представляли в виде среднего арифметического и стандартного отклонения от среднего, а статистическую значимость различий между группами оценивали при помощи критерия Краскела-Уоллиса с поправкой на множественные сравнения по критерию Данна (статистически значимыми считали значения $p \leq 0,05$).

Результаты

На первом этапе исследования был проведен анализ содержания провоспалительных цитокинов в культуральной среде от ЭК-КА и ЭК-ВГА. Для выполнения данной задачи было проведено одновременное измерение 109 провоспалительных цитокинов методом дот-блоттинга, что позволило детектировать фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-8 (IL-8/CXCL8), фактор привлечения моноцитов (MCP-1/CCL2), RANTES/CCL5, воспалительный белок макрофагов-3β (MIP-3β/CCL19), воспалительный белок макрофагов-3α (MIP-3α/CCL20), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), хемокины GROα/CXCL1, ENA-78/CXCL5, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 и SDF-1α/CXCL12, пентраксин-3 (PTX3) и интерлейкин-17A (IL-17A, рисунок, табл. 2).

Таблица 2. Денситометрический полуколичественный анализ результатов измерения уровня цитокинов (метод дот-блот-профилирования, хемилюминесцентная съемка) в предварительно центрифугированной (2000 × g) обогатенной (в 6 раз) бессывороточной культуральной среде от первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии (ЭК-КА) и внутренней грудной артерии (ЭК-ВГА) человека, инкубированных в течение 24 часов после достижения конfluence

Table 2. Semi-quantitative analysis of cytokine levels (dot blot profiling, chemiluminescent imaging, densitometry analysis) in the pre-centrifuged (2000 × g) and enriched (6-fold) serum-free cell culture supernatant from primary human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) incubated for 24 hours

| Место на мембране / Position on the membrane | Анализируемая молекула / Analyte | Номер гена / Gene number | ЭК-КА / HCAEC | ЭК-ВГА / HITAEC |
|--|----------------------------------|--------------------------|---------------|-----------------|
| A7,8 | Angiogenin | 283 | 37023 | 38850 |
| B13,14 | Cystatin C | 1471 | 11881 | 20601 |
| B15,16 | Dkk-1 | 22943 | 37294 | 38247 |
| B17,18 | DPP4 | 1803 | | 23357 |
| B19,20 | EGF | 1950 | 26090 | 42898 |
| B21,22 | CD147/Basigin/EMMPRIN | 682 | 21374 | 27241 |
| C3,4 | ENA-78/CXCL5 | 6374 | | 10837 |
| C5,6 | Endoglin/ENG/CD105 | 2022 | 11641 | 26854 |
| C13,14 | FGF-19 | 9965 | | 4886 |
| C19,20 | GDF-15 | 9518 | 32577 | 39695 |
| C21,22 | GM-CSF | 1437 | | 3540 |
| D1,2 | Groα/CXCL1 | 2919 | 30422 | 29867 |
| D5,6 | HGF | 3082 | | 7495 |
| E7,8 | IL-8/CXCL8 | 3576 | 38172 | 41190 |
| E21,22 | IL-17A | 3605 | | 7516 |
| E23,24 | IL-18 Bpa | 10068 | 16061 | 19246 |
| F19,20 | IP-10/CXCL10 | 3627 | | 1418 |
| F21,22 | I-TAC/CXCL11 | 6373 | | 6238 |
| G7,8 | MCP-1/CCL2 | 6347 | 31066 | 29559 |
| G11,12 | M-CSF | 1435 | | 2584 |
| G13,14 | MIF | 4282 | 32226 | 29422 |
| G19,20 | MIP-3α/CCL20 | 6364 | | 9923 |
| H5,6 | PDGF-AA | 5154 | 33986 | 27758 |
| H7,8 | PDGF-AB/BB | 5154/5155 | 6311 | 23456 |
| H9,10 | Pentraxin-3 | 5806 | | 10643 |
| H15,16 | RANTES/CCL5 | 6352 | | 30811 |
| H23,24 | SDF-1α/CXCL12 | 6387 | | 4528 |
| I1,2 | PAI-1/Serpin E1 | 5054 | 39036 | 41274 |
| I5,6 | ST2 | 9173 | 4778 | 13812 |
| I9,10 | TFF3 | 7033 | | 35219 |
| I15,16 | Thrombospondin-1/TSP-1 | 7057 | 15253 | 22241 |
| I19,20 | uPAR | 5329 | 19750 | 25473 |
| I21,22 | VEGF | 7422 | | 37348 |
| J7,8 | PECAM-1/CD31 | 5175 | 42458 | 37240 |
| J11,12 | VCAM-1/CD106 | 7412 | | 29356 |

Помимо провоспалительных цитокинов, такой способ анализа позволил детектировать про-ангиогенные молекулы (ангиогенин, DKK-1, FGF-19, GDF-15, HGF, IGFBP2, IGFBP-3, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TFF3), про-тромботические молекулы (PAI-1, TSP-1 и растворимая форма uPAR), а также растворимые формы эндотелиальных мембранных рецепторов (PECAM1/CD31, ENG/CD105, VCAM1/CD106, BSG/CD147, рисунок, табл. 2).

Для дальнейшего сравнения провоспалительного статуса ЭК-КА (выделенных из часто поражаемой атеросклерозом коронарной артерии) и ЭК-ВГА (выделенных из часто поражаемой атеросклерозом внутренней грудной артерии) в двух независимых экспериментах был выполнен анализ их генной экспрессии методом ОТ-кПЦР. Результаты первого эксперимента продемонстрировали сопоставимый уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов и рецепторов эндотелиальных клеток для лейкоцитов в ЭК-КА и ЭК-ВГА, при этом в ЭК-КА был повышен уровень экспрессии генов *MIF*, *IL6*, *CCL5*, *CSF3*, *CXCL1* и *SELP* и снижен уровень экспрессии генов *CXCL8*, *CCL20*, *CSF2*, *CXCL10*, *VCAM1*, *ICAM1* и *SELE* (табл. 3). Также ЭК-КА характеризовались повышенной экспрессией генов транскрипционных факторов

эндотелиально-мезенхимального перехода *SNAIL*, *SNAIL2*, *TWIST1* и *ZEB1*, ассоциированной с провоспалительной активацией эндотелия по данным наших предыдущих работ (табл. 3). Результаты второго эксперимента показали существенно большую выраженность провоспалительной активации ЭК-КА в сравнении с ЭК-ВГА (табл. 4). В частности, в ЭК-КА наблюдалось повышение экспрессии генов *MIF*, *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CCL5*, *CSF3*, *CXCL1*, *CXCL5*, *CXCL10*, *PTX3*, *VCAM1*, *SELE* и *SELP* и повышение экспрессии всех вышеупомянутых генов транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода при снижении всего лишь двух генов провоспалительных цитокинов (*CCL20* и *CSF2*, табл. 4). В совокупности данные результаты свидетельствовали о более выраженной провоспалительной активности ЭК-КА в сравнении с ЭК-ВГА, что вполне согласуется с меньшей устойчивостью КА к развитию атеросклероза в сравнении с ВГА.

Далее было выполнено ранжирование генов провоспалительных цитокинов друг относительно друга по четырем выборкам (ЭК-КА и ЭК-ВГА из двух экспериментов). Шестью наиболее экспрессируемыми ЭК-КА и ЭК-ВГА генами цитокинов были *MIF* (кодирующий фактор ингибирования мигра-

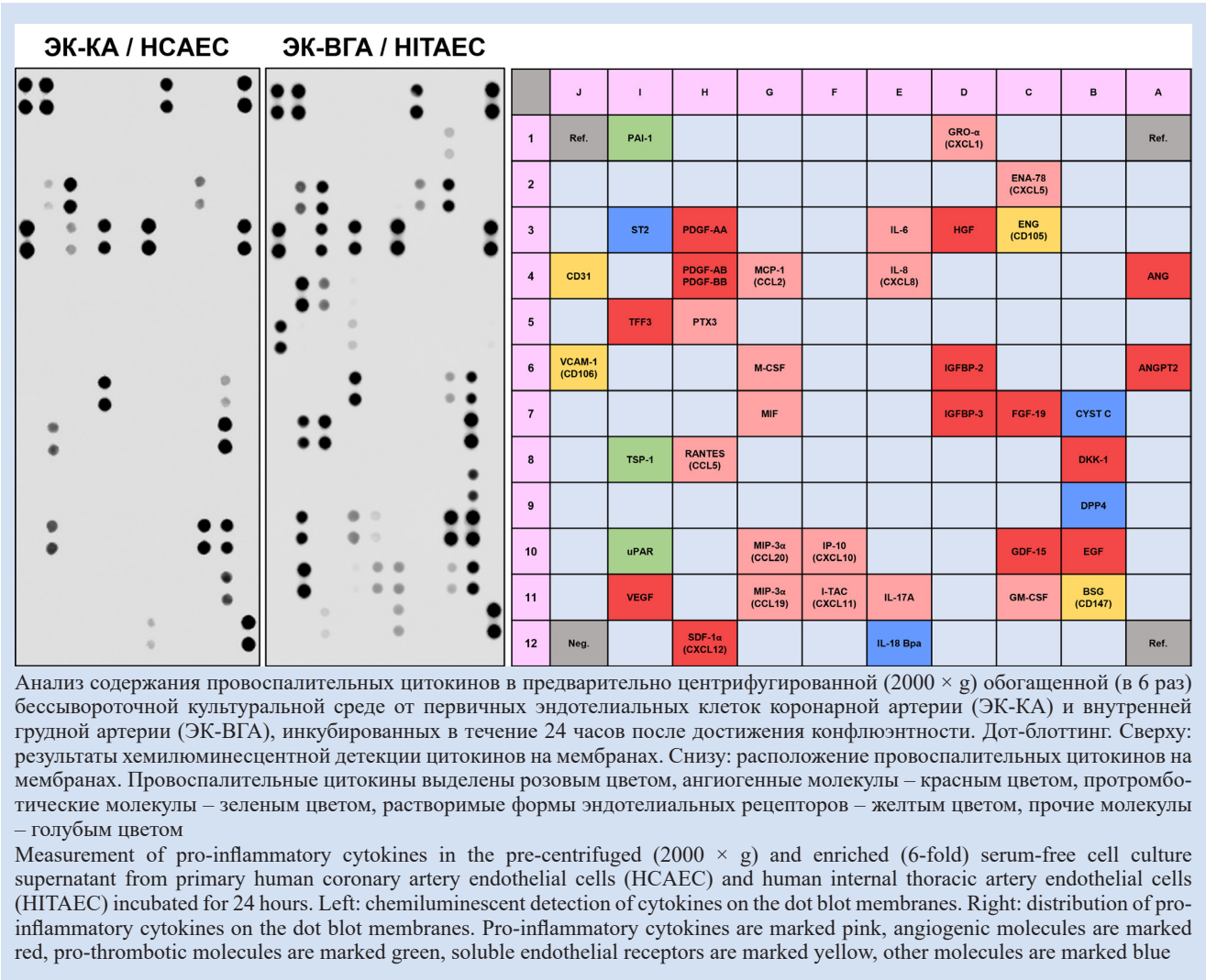


Таблица 3. Результаты первого эксперимента по анализу генной экспрессии первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии (ЭК-КА) и внутренней грудной артерии (ЭК-ВГА) человека, инкубированных в бессывороточной культуральной среде в течение 24 часов после достижения конfluence. Количественная полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции, нормализация на три референсных гена (*ACTB*, *GAPDH*, *B2M*). Относительный уровень экспрессии (ΔCt , среднее арифметическое и стандартное отклонение), ранг (ранжирование ЭК-КА и ЭК-ВГА по относительному уровню экспрессии друг относительно друга), кратность изменения экспрессии и статистическая значимость различий (значение вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу P) генов, кодирующих провоспалительные цитокины (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL5*, *CXCL10*, *PTX3*), провоспалительные молекулы клеточной адгезии (рецепторы эндотелиальных клеток для лейкоцитов *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*), транскрипционные факторы эндотелиально-мезенхимального перехода (*SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *ZEB1*) и маркер эндотелиального фенотипа (*NOS3*). U-критерий Манна–Уитни. Статистически значимые различия (кратности изменения экспрессии и соответствующие им значения P) помечены пурпурно-розовым цветом (в случае кратности изменения экспрессии $\geq 2,00$ и $P \leq 0,05$), бледно-розовым цветом (в случае кратности изменения экспрессии $\geq 2,00$ и $0,10 \leq P \leq 0,05$ либо кратности изменения экспрессии $2,00 < FC < 1,00$ и $P \leq 0,05$), темно-зеленым цветом (в случае кратности изменения экспрессии $\leq 0,50$ и $P \leq 0,05$) и светло-зеленым цветом (в случае кратности изменения экспрессии $\leq 0,50$ и $0,10 \leq P \leq 0,05$ либо кратности изменения экспрессии $1,00 < FC < 0,50$ и $P \leq 0,05$) и выделены жирным шрифтом

Table 3. Analysis of the gene expression in the primary human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) incubated in the serum-free cell culture medium for 24 hours after reaching the confluence. The results of the first experiment. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction, normalisation by three reference genes (*ACTB*, *GAPDH*, and *B2M*). Relative expression level (ΔCt , arithmetic mean and the standard deviation), rank (ranking of HCAEC and HITAEC by the relative expression level), fold change, and statistical significance (P value) of the genes encoding pro-inflammatory cytokines (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL5*, *CXCL10*, and *PTX3*), pro-inflammatory cell adhesion molecules (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, and *SELP*), endothelial-to-mesenchymal transition transcription factors (*SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, and *ZEB1*), and endothelial phenotype marker (*NOS3*). Mann–Whitney U-test. Statistically significant differences (fold change and the corresponding P values) are marked bright pink (fold change $\geq 2,00$ and P value $< 0,05$), pale pink (fold change $\geq 2,00$ and P value $0,10 \leq P \leq 0,05$, or fold change $2,00 < FC < 1,00$ and $P \leq 0,05$), dark green (fold change $\leq 0,50$ and P value $< 0,05$) and light green (fold change $\leq 0,50$ and P value $0,10 \leq P \leq 0,05$, or fold change $1,00 < FC < 0,50$ and $P \leq 0,05$) and marked bold

| Ген / Gene | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | ЭК-КА / HCAEC | ЭК- ВГА / HITAEC |
|---------------|--|------------------|------------------------|
| | ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation | | |
| | Ранг / Rank | | |
| | Кратность изменения / Fold change | | |
| | Значение P / P value | | |
| <i>MIF</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,38530 | 0,27530 |
| | ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation | 0,16600 | 0,15760 |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 |
| | Кратность изменения / Fold change | 1,40 | 1,00 |
| | Значение P / P value | 0,0266 | 1,000 |
| <i>IL6</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,01818 | 0,00847 |
| | ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation | 0,01306 | 0,00432 |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 |
| | Кратность изменения / Fold change | 2,15 | 1,00 |
| | Значение P / P value | 0,0034 | 1,000 |

| | | | |
|---------------|--|----------|---------|
| <i>CXCL8</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,03712 | 0,13960 |
| | ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation | 0,02600 | 0,05609 |
| | Ранг / Rank | 2 | 1 |
| | Кратность изменения / Fold change | 0,27 | 1,00 |
| | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 |
| <i>CCL2</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,75140 | 0,89080 |
| | ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation | 0,65020 | 0,40720 |
| | Ранг / Rank | 2 | 1 |
| | Кратность изменения / Fold change | 0,84 | 1,00 |
| | Значение P / P value | 0,1516 | 1,000 |
| <i>CCL5</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,00041 | 0,00009 |
| | ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation | 0,00053 | 0,00008 |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 |
| | Кратность изменения / Fold change | 4,57 | 1,00 |
| | Значение P / P value | 0,1011 | 1,000 |
| <i>CCL20</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,00031 | 0,00193 |
| | ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation | 0,00046 | 0,00157 |
| | Ранг / Rank | 2 | 1 |
| | Кратность изменения / Fold change | 0,16 | 1,00 |
| | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 |
| <i>CSF2</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,00032 | 0,00133 |
| | ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation | 0,00041 | 0,00235 |
| | Ранг / Rank | 2 | 1 |
| | Кратность изменения / Fold change | 0,24 | 1,00 |
| | Значение P / P value | 0,0224 | 1,000 |
| <i>CSF3</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,00233 | 0,00020 |
| | ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation | 0,00861 | 0,00015 |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 |
| | Кратность изменения / Fold change | 11,85 | 1,00 |
| | Значение P / P value | 0,8384 | 1,000 |
| <i>CXCL1</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,12670 | 0,06468 |
| | ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation | 0,05625 | 0,02791 |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 |
| | Кратность изменения / Fold change | 1,96 | 1,00 |
| | Значение P / P value | 0,0004 | 1,000 |
| <i>CXCL5</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,00045 | 0,00034 |
| | ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation | 0,00063 | 0,00037 |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 |
| | Кратность изменения / Fold change | 1,31 | 1,00 |
| | Значение P / P value | 0,6395 | 1,000 |
| <i>CXCL10</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,00030 | 0,01246 |
| | ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation | 0,00035 | 0,04705 |
| | Ранг / Rank | 2 | 1 |
| | Кратность изменения / Fold change | 0,02 | 1,00 |
| | Значение P / P value | 0,0376 | 1,000 |
| <i>PTX3</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,16040 | 0,11770 |
| | ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation | 0,18570 | 0,06001 |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 |
| | Кратность изменения / Fold change | 1,36 | 1,00 |
| | Значение P / P value | 0,5010 | 1,000 |
| <i>VCAM1</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,00024 | 0,00030 |
| | ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation | 0,00056 | 0,00024 |
| | Ранг / Rank | 2 | 1 |
| | Кратность изменения / Fold change | 0,81 | 1,00 |
| | Значение P / P value | 0,0132 | 1,000 |

| | | | |
|-------------------------------|---|----------|---------|
| ICAM1 | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,01485 | 0,03378 |
| | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,00658 | 0,02131 |
| | Ранг / Rank | 2 | 1 |
| | Кратность изменения / Fold change | 0,44 | 1,00 |
| | Значение P / P value | 0,0012 | 1,000 |
| SELE | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,00557 | 0,05953 |
| | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,00260 | 0,03510 |
| | Ранг / Rank | 2 | 1 |
| | Кратность изменения / Fold change | 0,09 | 1,00 |
| | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 |
| SELP | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,00770 | 0,00091 |
| | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,00675 | 0,00058 |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 |
| | Кратность изменения / Fold change | 8,42 | 1,00 |
| | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 |
| Сумма рангов / Total rank sum | | 24 | 24 |
| SNAI1 | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,01677 | 0,00490 |
| | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,01008 | 0,00204 |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 |
| | Кратность изменения / Fold change | 3,42 | 1,00 |
| | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 |
| SNAI2 | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,01289 | 0,00092 |
| | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,01027 | 0,00072 |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 |
| | Кратность изменения / Fold change | 13,99 | 1,00 |
| | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 |
| TWIST1 | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,00148 | 0,00042 |
| | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,00120 | 0,00043 |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 |
| | Кратность изменения / Fold change | 3,49 | 1,00 |
| | Значение P / P value | 0,0165 | 1,000 |
| ZEB1 | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,23760 | 0,14380 |
| | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,12000 | 0,06864 |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 |
| | Кратность изменения / Fold change | 1,65 | 1,00 |
| | Значение P / P value | 0,0293 | 1,000 |
| NOS3 | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,00937 | 0,00313 |
| | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,00635 | 0,00184 |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 |
| | Кратность изменения / Fold change | 2,99 | 1,00 |
| | Значение P / P value | 0,0002 | 1,000 |
| Сумма рангов / Total rank sum | | 5 | 10 |

ции макрофагов), *CCL2* (кодирующий фактор привлечения моноцитов MCP-1), *PTX3* (кодирующий пентраксин-3), *CXCL1* (кодирующий одноименный хемокин), *CXCL8* (кодирующий интерлейкин-8) и *IL6* (кодирующий интерлейкин-6, табл. 5). Первое и второе место по экспрессии во всех указанных выборках ЭК занимали либо *MIF*, либо *CCL2*; лишь в одной из четырех выборок экспрессия гена *PTX3* незначительно превышала экспрессию гена *CCL2* (табл. 5). Экспрессия вышеперечисленных шести генов была стабильно выше шести остальных (*CSF2*, *CXCL10*, *CXCL5*, *CCL20*, *CSF3*, *CCL5*), за исключением гена *IL6*, экспрессия которого в

Таблица 4. Результаты второго эксперимента по анализу генной экспрессии первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии (ЭК-КА) и внутренней грудной артерии (ЭК-ВГА) человека, инкубированных в бессывороточной культуральной среде в течение 24 часов после достижения конfluence. Количественная полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции, нормализация на три референсных гена (*ACTB*, *GAPDH*, *B2M*). Относительный уровень экспрессии (ΔCt, среднее арифметическое и стандартное отклонение), ранг (ранжирование ЭК-КА и ЭК-ВГА по относительному уровню экспрессии друг относительно друга), кратность изменения экспрессии и статистическая значимость различий (значение вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу *P*) генов, кодирующих провоспалительные цитокины (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL5*, *CXCL10*, *PTX3*), провоспалительные молекулы клеточной адгезии (рецепторы эндотелиальных клеток для лейкоцитов *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*), транскрипционные факторы эндотелиально-мезенхимального перехода (*SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *ZEB1*) и маркеры эндотелиального фенотипа (*NOS3*, *VWF*). Критерий Краскела-Уоллиса с последующей поправкой на множественные сравнения по критерию Данна. Статистически значимые различия (кратности изменения экспрессии и соответствующие им значения *P*) помечены пурпурно-розовым цветом (в случае кратности изменения экспрессии ≥ 2,00 и *P* ≤ 0,05), бледно-розовым цветом (в случае кратности изменения экспрессии ≥ 2,00 и 0,10 ≤ *P* ≤ 0,05 либо кратности изменения экспрессии 2,00 < *FC* < 1,00 и *P* ≤ 0,05), темно-зеленым цветом (в случае кратности изменения экспрессии ≤ 0,50 и *P* ≤ 0,05) и светло-зеленым цветом (в случае кратности изменения экспрессии ≤ 0,50 и 0,10 ≤ *P* ≤ 0,05 либо кратности изменения экспрессии 1,00 < *FC* < 0,50 и *P* ≤ 0,05) и выделены жирным шрифтом

Table 4. Analysis of the gene expression in the primary human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) incubated in the serum-free cell culture medium for 24 hours after reaching the confluence. The results of the second experiment. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction, normalisation by three reference genes (*ACTB*, *GAPDH*, and *B2M*). Relative expression level (ΔCt, arithmetic mean and the standard deviation), rank (ranking of HCAEC and HITAEC by the relative expression level), fold change, and statistical significance (*P* value) of the genes encoding pro-inflammatory cytokines (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL5*, *CXCL10*, and *PTX3*), pro-inflammatory cell adhesion molecules (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, and *SELP*), endothelial-to-mesenchymal transition transcription factors (*SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, and *ZEB1*), and endothelial phenotype markers (*NOS3* and *VWF*). Mann-Whitney U-test. Statistically significant differences (fold change and the corresponding *P* values) are marked bright pink (fold change ≥ 2,00 and *P* value < 0,05), pale pink (fold change ≥ 2,00 and *P* value 0,10 ≤ *P* ≤ 0,05, or fold change 2,00 < *FC* < 1,00 and *P* ≤ 0,05), dark green (fold change ≤ 0,50 and *P* value < 0,05) and light green (fold change ≤ 0,50 and *P* value 0,10 ≤ *P* ≤ 0,05, or fold change 1,00 < *FC* < 0,50 and *P* ≤ 0,05) and marked bold

| | | | |
|------------|---|---------------|-----------------|
| Ген / Gene | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | ЭК-КА / HCAEC | ЭК-ВГА / HITAEC |
| | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | | |
| | Ранг / Rank | | |
| | Кратность изменения / Fold change | | |
| | Значение P / P value | | |
| MIF | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 2,80800 | 0,29990 |
| | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,98100 | 0,08559 |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 |
| | Кратность изменения / Fold change | 9,36 | 1,00 |
| | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 |

| | | | | | | | | | |
|----------------------|---|----------|-----------------------------------|-------------------------------|---|----------|---------|----|----|
| IL6 | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,00722 | 0,00443 | VCAM1 | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,00200 | 0,00039 | | |
| | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,00288 | 0,00156 | | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,00148 | 0,00031 | | |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 | | Ранг / Rank | 1 | 2 | | |
| | Кратность изменения / Fold change | 1,63 | 1,00 | | Кратность изменения / Fold change | 5,14 | 1,00 | | |
| CXCL8 | Значение P / P value | 0,0016 | 1,000 | ICAM1 | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 | | |
| | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,13300 | 0,02943 | | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,05398 | 0,06455 | | |
| | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,05722 | 0,01748 | | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,05098 | 0,02816 | | |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 | | Ранг / Rank | 2 | 1 | | |
| CCL2 | Кратность изменения / Fold change | 4,52 | 1,00 | SELE | Кратность изменения / Fold change | 0,84 | 1,00 | | |
| | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 | | Значение P / P value | 0,1341 | 1,000 | | |
| | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 1,10700 | 0,30960 | | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,00478 | 0,00182 | | |
| | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,31680 | 0,07589 | | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,00367 | 0,00069 | | |
| CCL5 | Ранг / Rank | 1 | 2 | SELP | Ранг / Rank | 1 | 2 | | |
| | Кратность изменения / Fold change | 3,58 | 1,00 | | Кратность изменения / Fold change | 2,63 | 1,00 | | |
| | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 | | Значение P / P value | 0,0027 | 1,000 | | |
| | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,00252 | 0,00117 | | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,01192 | 0,00498 | | |
| CCL20 | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,00143 | 0,00083 | SNAI1 | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,01310 | 0,00230 | | |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 | | Ранг / Rank | 1 | 2 | | |
| | Кратность изменения / Fold change | 2,16 | 1,00 | | Кратность изменения / Fold change | 2,40 | 1,00 | | |
| | Значение P / P value | 0,0021 | 1,000 | | Значение P / P value | 0,4812 | 1,000 | | |
| CSF2 | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,00130 | 0,00284 | Сумма рангов / Total rank sum | | | 19 | 29 | |
| | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,00079 | 0,00537 | SNAI2 | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,05948 | 0,00174 | | |
| | Ранг / Rank | 2 | 1 | | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,02135 | 0,00079 | | |
| | Кратность изменения / Fold change | 0,46 | 1,00 | | Ранг / Rank | 1 | 2 | | |
| Значение P / P value | 0,8841 | 1,000 | Кратность изменения / Fold change | | 34,26 | 1,00 | | | |
| CSF3 | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,00420 | 0,02798 | TWIST1 | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 | | |
| | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,00323 | 0,01393 | | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,01624 | 0,00032 | | |
| | Ранг / Rank | 2 | 1 | | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,00881 | 0,00028 | | |
| | Кратность изменения / Fold change | 0,15 | 1,00 | | Ранг / Rank | 1 | 2 | | |
| CXCL1 | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 | ZEB1 | Кратность изменения / Fold change | 51,10 | 1,00 | | |
| | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,00307 | 0,00047 | | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 | | |
| | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,00238 | 0,00035 | | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,00192 | 0,00013 | | |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 | | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,00103 | 0,00006 | | |
| CXCL5 | Кратность изменения / Fold change | 6,52 | 1,00 | NOS3 | Ранг / Rank | 1 | 2 | | |
| | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 | | Кратность изменения / Fold change | 14,61 | 1,00 | | |
| | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,37560 | 0,05433 | | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 | | |
| | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,09999 | 0,01558 | | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,31580 | 0,04685 | | |
| PTX3 | Ранг / Rank | 1 | 2 | VWF | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,26270 | 0,02083 | | |
| | Кратность изменения / Fold change | 6,91 | 1,00 | | Ранг / Rank | 1 | 2 | | |
| | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 | | Кратность изменения / Fold change | 6,74 | 1,00 | | |
| | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,00642 | 0,00013 | | Значение P / P value | 0,0004 | 1,000 | | |
| CXCL10 | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,00786 | 0,00009 | VWF | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,15990 | 0,01757 | | |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 | | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,05965 | 0,00564 | | |
| | Кратность изменения / Fold change | 47,78 | 1,00 | | Ранг / Rank | 1 | 2 | | |
| | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 | | Кратность изменения / Fold change | 9,10 | 1,00 | | |
| PTX3 | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 0,00700 | 0,00095 | VWF | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 | | |
| | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,00499 | 0,00093 | | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 9,92400 | 1,17100 | | |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 | | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 3,27900 | 0,24520 | | |
| | Кратность изменения / Fold change | 7,41 | 1,00 | | Ранг / Rank | 1 | 2 | | |
| PTX3 | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 | VWF | Кратность изменения / Fold change | 8,47 | 1,00 | | |
| | ΔCt, среднее арифметическое / ΔCt, arithmetic mean | 1,12200 | 0,02251 | | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 | | |
| | ΔCt, стандартное отклонение / ΔCt, standard deviation | 0,29850 | 0,02664 | | Сумма рангов / Total rank sum | | | 6 | 12 |
| | Ранг / Rank | 1 | 2 | | | | | | |
| PTX3 | Кратность изменения / Fold change | 49,84 | 1,00 | | | | | | |
| | Значение P / P value | < 0,0001 | 1,000 | | | | | | |

двух выборках уступала экспрессии генов *CSF2* и *CXCL10* (табл. 5).

С целью дополнительного изучения экспрессии генов 14 цитокинов, определяемых в культуральной среде от ЭК-КА и ЭК-ВГА при дот-блоте (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL5*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL12* и *PTX3*), было проведено полнотранскриптомное секвенирование (RNA-seq) ДНК-библиотек, подготовленных после деплеции рРНК в образцах РНК, выделенной из лизата ЭК-КА. Проведенный биоинформатический анализ массивов данных полнотранскриптомного секвенирования (табл. 6) подтвердил результаты анализа генной экспрессии, полученные методом ОТ-кПЦР (табл. 5): наиболее экспрессируемыми генами провоспалительных цитокинов из вышеперечисленных были *MIF*, *CCL2*, *PTX3*, *CXCL1* и *CXCL8* (при этом относительный ранг их экспрес-

сии не отличался от такового при ОТ-кПЦР, табл. 6). Остальные гены (*CSF3*, *IL6*, *CXCL5*, *CXCL12*, *CXCL11*, *CCL5*, *CXCL10*, *CSF2*, *CCL20*) обладали существенно меньшей экспрессией, при этом ген *IL6* также находился в середине данного списка по интенсивности экспрессии (табл. 6). Сравнительный анализ экспрессии данных генов в дисфункциональных и контрольных ЭК выявил повышение кратности изменения экспрессии ≥ 2 применительно к 8 генам из 14 (*CXCL1*, *CXCL8*, *CXCL5*, *CXCL11*, *CCL5*, *CXCL10*, *CSF2* и *CCL20*), а также превышающую 1,5 кратность изменения экспрессии у еще трех генов (*CSF3*, *IL6* и *CCL2*, табл. 6).

Более широкий биоинформатический анализ выявил 40 генов цитокинов, экспрессированных в контрольных и дисфункциональных ЭК. Помимо вышеуказанных (*MIF*, *CCL2*, *PTX3*, *CXCL1*, *CXCL8*, *CSF3*, *IL6*), в число генов наиболее экспрессиро-

Таблица 5. Ранжирование генов провоспалительных цитокинов (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL5*, *CXCL10*, *PTX3*) по уровню экспрессии в первичных эндотелиальных клетках коронарной артерии (ЭК-КА) и внутренней грудной артерии (ЭК-ВГА) инкубированных в бессывороточной культуральной среде в течение 24 часов после достижения конfluence. Количественная полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции. Относительный уровень экспрессии (ΔCt , среднее арифметическое, нормализация на три референсных гена (*ACTB*, *GAPDH*, *B2M*) и ранг (ранжирование генов по относительному уровню экспрессии друг относительно друга)
Table 5. Ranking of genes encoding pro-inflammatory cytokines (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL5*, *CXCL10*, and *PTX3*) by expression level in primary human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) incubated in the serum-free cell culture medium for 24 hours after reaching the confluence. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction, relative expression level (ΔCt , arithmetic mean, normalisation by the reference genes *ACTB*, *GAPDH*, and *B2M*) and rank (ranking of the genes by the relative expression level)

| Ген / Gene | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | ЭК-КА Эксп-т 1 / HCAEC Exper. 1 | ЭК-ВГА Эксп-т 1 / HITAEC Exper. 1 | ЭК-КА Эксп-т 2 / HCAEC Exper. 2 | ЭК-ВГА Эксп-т 2 / HITAEC Exper. 2 | Среднее / Average |
|---------------|--|--|--|--|--|----------------------|
| | Ранг / Rank | | | | | |
| <i>MIF</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,38530 | 0,27530 | 2,80800 | 0,29990 | 0,94213 |
| | Ранг / Rank | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| <i>CCL2</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,75140 | 0,89080 | 1,10700 | 0,30960 | 0,76470 |
| | Ранг / Rank | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 |
| <i>PTX3</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,16040 | 0,11770 | 1,12200 | 0,02251 | 0,35565 |
| | Ранг / Rank | 3 | 4 | 2 | 6 | 3 |
| <i>CXCL1</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,12670 | 0,06468 | 0,37560 | 0,05433 | 0,15533 |
| | Ранг / Rank | 4 | 5 | 4 | 3 | 4 |
| <i>CXCL8</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,03712 | 0,13960 | 0,13300 | 0,02943 | 0,08479 |
| | Ранг / Rank | 5 | 3 | 5 | 4 | 5 |
| <i>IL6</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,01818 | 0,00847 | 0,00722 | 0,00443 | 0,00958 |
| | Ранг / Rank | 6 | 7 | 6 | 7 | 6 |
| <i>CSF2</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,00032 | 0,00133 | 0,00420 | 0,02798 | 0,00846 |
| | Ранг / Rank | 10 | 9 | 9 | 5 | 7 |
| <i>CXCL10</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,00030 | 0,01246 | 0,00700 | 0,00095 | 0,00518 |
| | Ранг / Rank | 12 | 6 | 7 | 10 | 8 |
| <i>CXCL5</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,00045 | 0,00034 | 0,00642 | 0,00013 | 0,00184 |
| | Ранг / Rank | 8 | 10 | 8 | 12 | 9 |
| <i>CCL20</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,00031 | 0,00193 | 0,00130 | 0,00284 | 0,00160 |
| | Ранг / Rank | 11 | 8 | 12 | 8 | 10 |
| <i>CSF3</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,00233 | 0,00020 | 0,00307 | 0,00047 | 0,00152 |
| | Ранг / Rank | 7 | 11 | 10 | 11 | 11 |
| <i>CCL5</i> | ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean | 0,00041 | 0,00009 | 0,00252 | 0,00117 | 0,00105 |
| | Ранг / Rank | 9 | 12 | 11 | 9 | 12 |

ванных цитокинов (антитела к которым не входят в коммерческую панель для дот-блота на рис. 1) вошли *IL32*, *TGFB1*, *LTB*, *CSF1*, *CCL14*, *IL33*, *CXCL16*, *CXCL2* и *IL1A* (табл. 7). Кратность изменения экспрессии $\geq 2,00$ в дисфункциональных ЭК в сравнении с контрольными наблюдали в генах *CSF2* (61,26), *CCL5* (32,41), *CCL20* (22,43), *CXCL5* (11,82), *CXCL8* (7,08), *CXCL3* (7,07), *CXCL11* (5,60), *IL1A* (5,17), *CXCL6* (4,91), *IFNE* (4,75), *CCL16* (4,63), *CXCL2* (4,33), *LTB* (4,18), *LTA* (3,56), *IL23A* (3,01), *CSF1* (2,70), *CXCL1* (2,67) и *CXCL10* (2,08); кратность изменения экспрессии $< 2,00$, но $\geq 1,50$ – в генах *CSF3* (1,85), *IL6* (1,82), *IL32* (1,72), *TGFB1* (1,61), *CCL2* (1,55) и *IL7* (1,50, табл. 7). Таким обра-

Таблица 6. Результаты анализа полнотранскриптного секвенирования первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (ЭК-КА), инкубированных в бессывороточной культуральной среде в течение 24 часов после достижения конfluence. Количество транскриптов генов интереса (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL5*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL12*, *PTX3*) на миллион прочтений (transcripts per million, TPM) и кратность изменения экспрессии (fold change) при сравнительном анализе дисфункциональных и контрольных клеток. Гены с кратностью изменения экспрессии $2,00 < FC < 1,50$ выделены светло-желтым цветом, гены с кратностью изменения экспрессии $\geq 2,00$ – темно-желтым цветом

Table 6. Analysis of the whole transcriptome sequencing (RNA sequencing, RNA-seq) of primary human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human saphenous vein endothelial cells (HSAVEC) incubated in the serum-free cell culture medium for 24 hours after reaching the confluence. Transcripts of *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL5*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL12*, and *PTX3* genes per million (TPM) and fold change during the analysis of dysfunctional and intact ECs. Genes with fold change $2,00 < FC < 1,50$ and $\geq 2,00$ are marked light yellow and dark yellow, respectively

| Ген / Gene | Среднее значение количества транскриптов на миллион прочтений в контрольной группе / Mean TPM in the intact ECs | Среднее значение количества транскриптов на миллион прочтений в группе дисфункции эндотелия / Mean TPM in the dysfunctional ECs | Кратность изменения экспрессии / Fold change |
|---------------|---|---|--|
| <i>MIF</i> | 1 745,61 | 653,63 | 0,37 |
| <i>CCL2</i> | 1 016,46 | 1 580,36 | 1,55 |
| <i>PTX3</i> | 298,34 | 390,25 | 1,31 |
| <i>CXCL1</i> | 165,17 | 440,92 | 2,67 |
| <i>CXCL8</i> | 45,56 | 322,49 | 7,08 |
| <i>CSF3</i> | 7,64 | 14,17 | 1,85 |
| <i>IL6</i> | 4,97 | 9,02 | 1,82 |
| <i>CXCL5</i> | 3,82 | 45,20 | 11,82 |
| <i>CXCL12</i> | 2,78 | 2,77 | 1,00 |
| <i>CXCL11</i> | 1,44 | 8,05 | 5,60 |
| <i>CCL5</i> | 1,01 | 32,58 | 32,41 |
| <i>CXCL10</i> | 0,32 | 0,66 | 2,08 |
| <i>CSF2</i> | 0,28 | 17,37 | 61,26 |
| <i>CCL20</i> | 0,27 | 6,15 | 22,43 |

зом, правомерно говорить о том, что артериальные ЭК экспрессируют около 40 цитокинов, из которых около 24 характеризуются повышенной экспрессией при провоспалительной активации эндотелия (табл. 7). При этом значения TPM в контрольной группе ($TPM_{Ctrl} > 2,5$ (условно говорящие об экспрессии, относительно стабильно детектируемой при ОТ-кПЦР) также наблюдались для 24 генов цитокинов (*MIF*, *CCL2*, *PTX3*, *IL32*, *CXCL1*, *TGFB1*, *LTB*, *CXCL8*, *CSF1*, *CCL14*, *TGFB2*, *IL33*, *CXCL16*, *CXCL2*, *IL1A*, *CSF3*, *IL6*, *IL17D*, *CXCL3*, *CXCL6*, *IL12A*, *CXCL5*, *TGFB3* и *CXCL12*), из которых лишь у 14 генов отмечалась повышенная экспрессия при дисфункции эндотелия (*CCL2*, *IL32*, *CXCL1*, *TGFB1*, *LTB*, *CXCL8*, *CSF1*, *CXCL2*, *IL1A*, *CSF3*, *IL6*, *CXCL3*, *CXCL6* и *CXCL5*, табл. 7).

Аналогичный анализ рецепторных молекул клеточной адгезии выявил повышение кратности изменения экспрессии $\geq 2,00$ в дисфункциональных ЭК в сравнении с контрольными для генов *ICAM1* (2,17), *SELE* (5,17), *VCAM1* (4,09), *CEACAM1* (6,83), *ICAM4* (5,36), *NCAM2* (3,99), *MADCAM1* (20,77), *ICAM5* (2,70), *EPCAM* (15,97), *HEPACAM* (13,64) и *LICAM* (481,40), а также повышение кратности изменения экспрессии $\geq 1,50$ для генов *NRCAM* (1,50) и *ALCAM* (1,97, табл. 7). Таким образом, повышенной экспрессией при дисфункции артериальных ЭК характеризовались около 13 генов провоспалительных молекул клеточной адгезии, при этом значения $TPM_{Ctrl} > 2,5$ из них детектировались лишь для 5 (*ICAM1*, *NRCAM*, *ALCAM*, *SELE* и *VCAM1*, табл. 7). Значения $TPM_{Ctrl} > 2,5$ детектировались для такого же количества генов данного класса, хотя состав их был несколько другим (*PECAM1*, *MCAM*, *ICAM2*, *ICAM1*, *NRCAM*, *CERCAM*, *ALCAM*, *SELE*, *SELP*, *VCAM*, *CEACAM19*, *ICAM3* и *VCAM1*).

В завершение работы был проведен анализ прочих генов сигнальных путей врожденного иммунного ответа, исключая проанализированные выше цитокины и молекулы клеточной адгезии. К таким генам были отнесены рецепторы распознавания паттернов, растворимые формы рецепторов к цитокинам, лиганды и рецепторы сигнального пути TNF, внутриклеточные белки провоспалительных сигнальных путей, белки сигнального пути интерферонов и белки теплового шока. Биоинформатический анализ результатов полнотранскриптного секвенирования показал гиперэкспрессию (кратность изменения экспрессии $\geq 1,50$) 55 провоспалительных генов в дисфункциональных ЭК (табл. 8). Наибольшей гиперэкспрессией в дисфункциональных ЭК (кратностью изменения экспрессии $\geq 4,00$) среди данных генов обладали гены сигнального пути интерферонов *IFI30*, *IFI44* и *IFIT3* (кратность изменения экспрессии 11,57, 4,93 и 4,45 соответственно), ген лиганда сигнального пути фактора некроза опухоли *TNFSF9* (кратность изменения

Таблица 7. Результаты анализа полнотранскриптомного секвенирования первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (ЭК-КА), инкубированных в бессывороточной культуральной среде в течение 24 часов после достижения конфлюэнтности. Общее количество транскрибируемых в ЭК цитокинов. Количество транскриптов генов провоспалительных цитокинов и молекул клеточной адгезии на миллион прочтений (transcripts per million, TPM) и кратность изменения экспрессии (fold change) при сравнительном анализе дисфункциональных и контрольных клеток. Гены с кратностью изменения экспрессии $2,00 < FC < 1,50$ выделены светло-желтым цветом, гены с кратностью изменения экспрессии $\geq 2,00$ – темно-желтым цветом

Table 7. Analysis of the whole transcriptome sequencing (RNA sequencing, RNA-seq) of primary human coronary artery endothelial cells (HCAEC) incubated in the serum-free cell culture medium for 24 hours after reaching the confluence. List of pro-inflammatory cytokines and cell adhesion molecules expressed in HCAEC and HITAEC. Transcripts of pro-inflammatory genes per million (TPM) and fold change during the analysis of dysfunctional and intact ECs. Genes with fold change $2,00 < FC < 1,50$ and $\geq 2,00$ are marked light yellow and dark yellow, respectively

| Ген / Gene | Среднее значение количества транскриптов на миллион прочтений в контрольной группе / Mean TPM in the intact ECs | Среднее значение количества транскриптов на миллион прочтений в группе дисфункции эндотелия / Mean TPM in the dysfunctional ECs | Кратность изменения экспрессии / Fold change |
|---|---|---|--|
| Провоспалительные цитокины / Pro-inflammatory cytokines | | | |
| MIF | 1745,61 | 653,63 | 0,37 |
| CCL2 | 1016,46 | 1580,36 | 1,55 |
| PTX3 | 298,34 | 390,25 | 1,31 |
| IL32 | 237,37 | 407,54 | 1,72 |
| CXCL1 | 165,17 | 440,92 | 2,67 |
| TGFB1 | 91,48 | 147,15 | 1,61 |
| LTB | 69,76 | 291,91 | 4,18 |
| CXCL8 | 45,56 | 322,49 | 7,08 |
| CSF1 | 42,11 | 113,84 | 2,70 |
| CCL14 | 34,68 | 26,50 | 0,76 |
| TGFB2 | 27,12 | 6,55 | 0,24 |
| IL33 | 21,80 | 2,09 | 0,10 |
| CXCL16 | 15,01 | 7,03 | 0,47 |
| CXCL2 | 13,70 | 59,35 | 4,33 |
| IL1A | 7,74 | 40,04 | 5,17 |
| CSF3 | 7,64 | 14,17 | 1,85 |
| IL6 | 4,97 | 9,02 | 1,82 |
| IL17D | 4,76 | 4,17 | 0,88 |
| CXCL3 | 4,67 | 33,01 | 7,07 |
| CXCL6 | 4,36 | 21,42 | 4,91 |
| IL12A | 4,35 | 3,38 | 0,78 |
| CXCL5 | 3,82 | 45,20 | 11,82 |
| TGFB3 | 3,36 | 2,04 | 0,61 |
| CXCL12 | 2,78 | 2,77 | 1,00 |
| TNF | 1,73 | 1,32 | 0,76 |
| CXCL11 | 1,44 | 8,05 | 5,60 |
| IL15 | 1,38 | 1,49 | 1,08 |
| CCL5 | 1,01 | 32,58 | 32,41 |
| IL23A | 0,89 | 2,69 | 3,01 |
| IL16 | 0,69 | 0,23 | 0,33 |
| TGFA | 0,62 | 0,59 | 0,95 |
| CCL28 | 0,54 | 0,04 | 0,07 |
| CXCL10 | 0,32 | 0,66 | 2,08 |
| IL7 | 0,31 | 0,47 | 1,50 |
| CSF2 | 0,28 | 17,37 | 61,26 |
| IFNE | 0,28 | 1,35 | 4,75 |
| CCL20 | 0,27 | 6,15 | 22,43 |
| CCL16 | 0,25 | 1,15 | 4,63 |
| IL34 | 0,21 | 0,19 | 0,89 |
| IL17C | 0,14 | 0,01 | 0,07 |
| LTA | 0,10 | 0,35 | 3,56 |
| Молекулы клеточной адгезии / Cell adhesion molecules | | | |
| PECAM1 | 2621,60 | 1643,26 | 0,63 |
| MCAM | 1407,90 | 1401,50 | 1,00 |
| ICAM2 | 763,28 | 327,15 | 0,43 |
| ICAM1 | 136,15 | 294,84 | 2,17 |
| NRCAM | 96,92 | 147,57 | 1,52 |
| CERCAM | 82,12 | 23,83 | 0,29 |
| ALCAM | 53,76 | 105,82 | 1,97 |
| SELE | 24,98 | 129,27 | 5,17 |
| SELP | 19,73 | 4,52 | 0,23 |
| BCAM | 15,47 | 19,45 | 1,26 |
| CEACAM19 | 12,22 | 6,33 | 0,52 |
| ICAM3 | 10,65 | 9,59 | 0,90 |
| VCAM1 | 8,14 | 33,26 | 4,09 |
| CEACAM1 | 2,25 | 15,36 | 6,83 |
| CEACAM21 | 2,10 | 1,93 | 0,92 |
| SELL | 1,67 | 1,45 | 0,87 |
| NCAM1 | 0,079 | 0,013 | 0,17 |
| ICAM4 | 0,073 | 0,391 | 5,36 |
| NCAM2 | 0,034 | 0,137 | 3,99 |
| MADCAM1 | 0,021 | 0,438 | 20,77 |
| ICAM5 | 0,006 | 0,016 | 2,70 |
| EPCAM | 0,005 | 0,078 | 15,97 |
| HEPACAM | 0,005 | 0,064 | 13,64 |
| LICAM | 0,001 | 0,344 | 481,40 |

ОРИГИНАЛЬНЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ

экспрессии 8,60), ген внутриклеточного провоспалительного белка *TRAF1* (кратность изменения экспрессии 5,77), ген провоспалительного транскрипционного фактора *ATF3* (кратность изменения экспрессии 4,76), ген рецептора к интерлейкину-7 *IL7R* (кратность изменения экспрессии 4,60) и ген белка теплового шока *HSPA4L* (кратность изменения экспрессии 4,15, табл. 8).

Таким образом, повышение экспрессии генов провоспалительных цитокинов (24 гена) и молекул клеточной адгезии (13 генов) сопровождалось повышением экспрессии генов прочих сигнальных путей провоспалительной активации, в особенности молекул сигнального пути интерферонов (11 генов), лигандов и рецепторов сигнального пути TNF (12 генов) и молекул внутриклеточных сигнальных каскадов (18 генов, табл. 8). В совокупности это свидетельствовало о выраженной провоспалительной активации эндотелия по различным сигнальным путям (через сигнальные пути рецепторов к цитокинам, сигнальный путь фактора некроза опухоли и сигнальный путь интерферонов) с участием транскрипционного фактора NF-κB (гиперэкспрессия гена *RELB* с кратностью изменения экспрессии 1,99) и активирующих транскрипционных факторов (гиперэкспрессия гена *ATF3* с кратностью изменения 4,76, табл. 8). При этом гиперэкспрессия ряда белков теплового шока (в том числе гена *HSP90A1*) указывала на выраженный клеточный стресс, являющийся характерным признаком провоспалительной активации ЭК (табл. 8). Также следует отметить фактическое отсутствие феномена повышения экспрессии генов рецепторов распознавания паттернов (Toll-подобных рецепторов и NOD-подобных рецепторов), за исключением гена *TLR1* (с кратностью изменения экспрессии 1,87) и гена *NLRC5* (с кратностью изменения экспрессии 1,55, табл. 8).

Обсуждение

Провоспалительная активация ЭК, проявляющаяся увеличением экспрессии молекул клеточной адгезии и повышением выделения широкого спектра цитокинов, является одним из основных патологических последствий развития дисфункции эндотелия [13]. В силу распространенности атеросклероза и патогенетической важности дисфункции эндотелия как пускового фактора его развития особый интерес в контексте развития провоспалительной дисфункции вызывают артериальные ЭК. В данном исследовании был проведен анализ экспрессии провоспалительных цитокинов и молекул клеточной адгезии, выделяемых ЭК чувствительной к развитию атеросклероза коронарной артерии и относительно устойчивой к развитию атеросклероза внутренней грудной артерии. Профилирование цитокинов в культуральной среде от ЭК-КА и ЭК-ВГА методом дот-блоттинга выявило

многообразие провоспалительных молекул (MIF, IL-6, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, MIP-3β/CCL19, MIP-3α/CCL20, GM-CSF, G-CSF, GROα/CXCL1, ENA-78/CXCL5, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11, SDF-1α/CXCL12, PTX3 и IL-17A), что послужило обоснованием для верификации их синтеза при помощи ОТ-кПЦР и последующего расширенного скрининга посредством полнотранскриптомного секвенирования.

Анализ генной экспрессии продемонстрировал наличие 24 генов цитокинов с $TPM_{Ctrl} > 2,5$ (*MIF*, *CCL2*, *PTX3*, *IL32*, *CXCL1*, *TGFB1*, *LTB*, *CXCL8*, *CSF1*, *CCL14*, *TGFB2*, *IL33*, *CXCL16*, *CXCL2*, *IL1A*, *CSF3*, *IL6*, *IL17D*, *CXCL3*, *CXCL6*, *IL12A*, *CXCL5*, *TGFB3* и *CXCL12*) и 24 генов цитокинов с повышением кратности изменения экспрессии $\geq 1,5$ при провоспалительной дисфункции эндотелия (*CSF2*, *CCL5*, *CCL20*, *CXCL5*, *CXCL8*, *CXCL3*, *CXCL11*, *IL1A*, *CXCL6*, *IFNE*, *CCL16*, *CXCL2*, *LTB*, *LTA*, *IL23A*, *CSF1*, *CXCL1*, *CXCL10*, *CSF3*, *IL6*, *IL32*, *TGFB1*, *CCL2* и *IL7*). В контексте планируемого создания наборов реагентов для определения содержания провоспалительных цитокинов методом дот-блоттинга (которые могут включить в себя антитела к 22 молекулам в расширенном и к 11 молекулам в упрощенном варианте) следует отметить, что лишь 14 генов цитокинов имели $TPM_{Ctrl} > 2,5$ и кратность изменения экспрессии $\geq 1,5$ (*CCL2*, *IL32*, *CXCL1*, *TGFB1*, *LTB*, *CXCL8*, *CSF1*, *CXCL2*, *IL1A*, *CSF3*, *IL6*, *CXCL3*, *CXCL6* и *CXCL5*). В рамках создания набора для определения содержания 22 провоспалительных цитокинов (на основе списка из 24 цитокинов с повышенной экспрессией в дисфункциональных ЭК) представляется справедливым исключить из этого перечня LTA и IL7 (в силу TPM_{Ctrl} и $TPM_{Dysf} < 0,5$). Таким образом, все остальные детектируемые при дот-блоттинге молекулы будут характеризоваться TPM_{Ctrl} и $TPM_{Dysf} > 0,5$ и кратностью изменения экспрессии $\geq 1,5$ (в группе дисфункции эндотелия в сравнении с контрольной). В отличие от панелей анализа генной экспрессии (где значение $TPM_{Ctrl} > 2,5$ представляется необходимым для стабильной детекции количества транскриптов и адекватного расчета кратности изменения экспрессии), панели для дот-блота могут основываться скорее на сочетании кратности изменения экспрессии и величины TPM_{Dysf} (для надежной детекции белка в культуральной среде от дисфункциональных клеток). Это позволяет включить в панель для анализа провоспалительной активации эндотелия методом дот-блоттинга антитела к молекулам с $TPM_{Ctrl} \leq 1$, но кратностью изменения экспрессии > 20 и $TPM_{Dysf} > 5$ (*CSF2*, *CCL5*, *CCL20*). С учетом вышеуказанной особенности более сложной задачей представляется отбор 11 цитокинов для упрощенного варианта панели. Вероятнее всего, из этого списка следует отобрать гены

Таблица 8. Результаты анализа полнотранскриптомного секвенирования первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (ЭК-КА), инкубированных в бессывороточной культуральной среде в течение 24 часов после достижения конfluence. Мануально отобранные гены сигнальных путей врожденного иммунного ответа (за исключением провоспалительных цитокинов и молекул клеточной адгезии). Количество транскриптов генов провоспалительных цитокинов и молекул клеточной адгезии на миллион прочтений (transcripts per million, TPM) и кратность изменения экспрессии (fold change) при сравнительном анализе дисфункциональных и контрольных клеток. Приведены исключительно гены с TPM ≥ 5 в контрольных либо дисфункциональных ЭК, а также кратностью изменения экспрессии ≥ 1,50

Table 8. Analysis of the whole transcriptome sequencing (RNA sequencing, RNA-seq) of primary human coronary artery endothelial cells (HCAEC) incubated in the serum-free cell culture medium for 24 hours after reaching the confluence. List of manually curated genes within the innate immune response signaling pathways (excepting pro-inflammatory cytokines and cell adhesion molecules) expressed in HCAEC and HITAEC. Transcripts of pro-inflammatory genes per million (TPM) and fold change during the analysis of dysfunctional or intact ECs. The list is restricted to the genes with TPMCtrl ≥ 5 or TPMDYSF ≥ 5 and fold change ≥ 1,50

| Ген / Gene | Среднее значение количества транскриптов на миллион прочтений в контрольной группе / Mean TPM in the intact ECs | Среднее значение количества транскриптов на миллион прочтений в группе дисфункции эндотелия / Mean TPM in the dysfunctional ECs | Кратность изменения экспрессии / Fold change |
|---|---|---|--|
| Рецепторы распознавания паттернов / Pattern recognition receptors | | | |
| <i>TLR1</i> | 2,67 | 5,01 | 1,87 |
| <i>NLRC5</i> | 4,90 | 7,57 | 1,55 |
| Рецепторы к цитокинам / Cytokine receptors | | | |
| <i>IL7R</i> | 1,92 | 8,86 | 4,60 |
| <i>IL18R1</i> | 2,61 | 8,85 | 3,39 |
| <i>LTB4R2</i> | 2,33 | 6,91 | 2,97 |
| <i>TGFBRI</i> | 5,49 | 15,19 | 2,77 |
| <i>IL13RA1</i> | 50,95 | 81,59 | 1,60 |
| Лиганды сигнального пути TNF / Ligands of TNF signaling pathway | | | |
| <i>TNFSF9</i> | 0,91 | 7,79 | 8,60 |
| <i>TNFSF4</i> | 37,65 | 135,31 | 3,59 |
| <i>TNFAIP8</i> | 2,02 | 5,28 | 2,62 |
| <i>TNFAIP2</i> | 22,88 | 53,60 | 2,34 |
| <i>TNFSF18</i> | 32,08 | 73,38 | 2,29 |
| <i>TNFSF10</i> | 53,20 | 99,78 | 1,88 |
| <i>TNFSF12</i> | 17,93 | 27,70 | 1,54 |
| Рецепторы сигнального пути TNF / TNF signaling pathway receptors | | | |
| <i>TNFRSF9</i> | 1,95 | 6,99 | 3,58 |
| <i>TNFRSF4</i> | 15,01 | 40,26 | 2,68 |
| <i>TNFRSF10B</i> | 191,97 | 319,77 | 1,67 |
| <i>TNFRSF25</i> | 14,86 | 24,20 | 1,63 |
| <i>TNFRSF10A</i> | 22,94 | 35,33 | 1,54 |
| Внутриклеточные провоспалительные белки / Intracellular pro-inflammatory proteins | | | |
| <i>TRAF1</i> | 13,33 | 76,97 | 5,77 |
| <i>ATF3</i> | 9,45 | 45,02 | 4,76 |
| <i>TRAF3IP1</i> | 4,72 | 15,01 | 3,18 |
| <i>TRIM23</i> | 3,97 | 10,19 | 2,57 |
| <i>TRAF5</i> | 9,07 | 22,61 | 2,49 |
| <i>TRIM22</i> | 75,64 | 167,16 | 2,21 |
| <i>TRIM52</i> | 2,79 | 5,88 | 2,11 |
| <i>TRIM38</i> | 15,77 | 32,01 | 2,03 |
| <i>RELB</i> | 27,79 | 55,18 | 1,99 |
| <i>MYDGF</i> | 87,84 | 174,11 | 1,98 |
| <i>TRIM56</i> | 14,90 | 28,40 | 1,91 |
| <i>TRIM37</i> | 27,44 | 45,63 | 1,66 |
| <i>LTA4H</i> | 35,32 | 58,62 | 1,66 |
| <i>TRIM47</i> | 45,76 | 75,82 | 1,66 |
| <i>TRIM34</i> | 6,01 | 9,68 | 1,61 |
| <i>TRIM35</i> | 15,95 | 25,63 | 1,61 |
| <i>TRIM59</i> | 4,57 | 7,08 | 1,55 |
| Белки сигнального пути интерферонов / Interferon signaling pathway proteins | | | |
| <i>IFI30</i> | 0,71 | 8,20 | 11,57 |
| <i>IFI44</i> | 4,09 | 20,17 | 4,93 |
| <i>IFIT3</i> | 2,05 | 9,11 | 4,45 |
| <i>IFIH1</i> | 6,09 | 22,34 | 3,67 |
| <i>IFI27L1</i> | 1,85 | 5,54 | 2,99 |
| <i>IFIT5</i> | 4,64 | 9,84 | 2,12 |
| <i>IFNAR1</i> | 26,08 | 53,16 | 2,04 |
| <i>IFRD1</i> | 8,04 | 15,83 | 1,97 |
| <i>IFI27</i> | 51,07 | 95,67 | 1,87 |
| <i>IFNGR1</i> | 51,14 | 95,22 | 1,86 |
| <i>IFI27L2</i> | 28,50 | 50,14 | 1,76 |
| Белки теплового шока / Heat shock proteins | | | |
| <i>HSPA4L</i> | 3,63 | 15,09 | 4,15 |
| <i>HSPE1-MOB4</i> | 4,15 | 11,74 | 2,83 |
| <i>HSPA4</i> | 50,29 | 97,11 | 1,93 |
| <i>HSP90AA1</i> | 264,05 | 497,49 | 1,88 |
| <i>HSPH1</i> | 20,98 | 38,58 | 1,84 |
| <i>HSPA13</i> | 28,42 | 51,66 | 1,82 |
| <i>HSPE1</i> | 37,40 | 67,96 | 1,82 |
| <i>HSPD1</i> | 45,86 | 81,51 | 1,78 |

ORIGINAL STUDIES

цитокинов с наиболее высокой кратностью изменения экспрессии (> 4) и $TPM_{Dysf} > 5$ (а именно *CSF2*, *CCL5*, *CCL20*, *CXCL5*, *CXCL8*, *CXCL3*, *CXCL11*, *IL1A*, *CXCL6*, *CXCL2* и *LTB*). С одной стороны, такой набор не будет включать в себя антитела к наиболее часто определяемым эндотелиальным цитокинам (*IL6*, *CCL2*, *CXCL1*), с другой – он будет сфокусирован именно на индуцибельных провоспалительных цитокинах и также будет содержать антитела к *CXCL8* (*IL8*). Проведенный корреляционный анализ 132 измерений от 12 доноров показал достаточно сильную корреляционную связь *IL8* с *MCP-1/CCL2* (0,679), что частично нивелирует отсутствие антител к *MCP-1/CCL2* в предлагаемом варианте панели для дот-блоттинга. В то же время следует отметить практически полное отсутствие корреляционной связи между *IL8* и *IL6* (0,148), а также между *IL6* и *MCP-1/CCL2* (–0,108). Полученные результаты в целом согласуются с данными литературы, подтверждающими выделение цитокинов данного спектра различными типами ЭК [14].

Следует также отметить повышение экспрессии других генов провоспалительной активации эндотелия (генов рецепторов к цитокинам, генов лигандов и рецепторов сигнального пути *TNF*, генов молекул сигнального пути интерферонов и генов иных внутриклеточных провоспалительных белков), а также генов белков теплового шока, активируемых при провоспалительной активации эндотелия [14, 15]. В совокупности такое изменение профиля генной экспрессии (55 гиперэкспрессированных генов внутриклеточных сигнальных каскадов воспаления) подтверждает выраженность провоспалительной активации эндотелия и соответствует значительному количеству гиперэкспрессированных генов провоспалительных цитокинов (24).

Аналогичный анализ экспрессии генов рецепторных молекул клеточной адгезии выявил 13 соответствующих генов с $TPM_{Ctrl} > 2,5$ (*PECAM1*, *MCAM*, *ICAM2*, *ICAM1*, *NRCAM*, *CERCAM*, *ALCAM*, *SELE*, *SELP*, *VCAM*, *CEACAM19*, *ICAM3* и *VCAM1*) и 13 генов с повышением кратности изменения экспрессии $\geq 1,5$ при провоспалительной дисфункции эндотелия (*ICAM1*, *SELE*, *VCAM1*, *CEACAM1*, *ICAM4*, *NCAM2*, *MADCAM1*, *ICAM5*, *EPICAM*, *HEPACAM*, *LICAM*, *NRCAM* и *ALCAM*). Классически для определения дисфункции эндотелия используются лишь три из них (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*) [15]. С учетом того, что все остальные молекулы клеточной адгезии имеют значения $TPM_{Ctrl} < 2,5$ (что не позволяет обеспечить их стабильную детекцию при ОТ-кПЦР) либо кратность изменения экспрессии < 2 (в частности, *NRCAM* и *ALCAM*), представляется рациональным не включать их в панели для определения дисфункции эндотелия *in vitro*. Несмотря на то, что кратность изменения экспрессии $> 1,5$ формально может яв-

ляться пороговой (и была в целом принята таковой в данном исследовании), на практике определение экспрессии генов молекул клеточной адгезии при дисфункции эндотелия требует однозначного ответа на вопрос об их повышении при минимальных время- и трудозатратах, так как это сопровождается измерением экспрессии большого количества генов провоспалительных цитокинов. Поэтому представляется достаточным оставить неизменной существующую практику определения лишь трех вышеуказанных генов молекул клеточной адгезии из всех перечисленных – *VCAM1*, *ICAM1* и *SELE*.

В сравнении с выделяемыми из устойчивой к развитию атеросклероза ЭК-ВГА выделяемые из чувствительной к развитию атеросклероза ЭК-КА характеризовались более высоким уровнем провоспалительной активации (в частности, устойчивым и статистически значимым повышением экспрессии генов *MIF*, *IL6*, *CCL5*, *CSF3*, *CXCL1* и *SELP* в сравнении с ЭК-ВГА). Вероятнее всего, исходно более высокий провоспалительный статус ЭК-КА является одной из причин ускоренного развития атеросклероза в КА в сравнении с ВГА, что согласуется с литературными данными о повышенном выделении ЭК-ВГА одного из ключевых вазодилататоров – монооксида азота (NO) [15]. Последующие эксперименты по сравнению ЭК-КА и ЭК-ВГА, а также физиологического и патологического (дисфункционального) эндотелиальных фенотипов, вероятнее всего, могут быть направлены на анализ интенсивности транскрипции и синтеза компонентов базальной мембраны и субэндотелиального внеклеточного матрикса, которые в значительной степени обуславливают поддержание эндотелиального гомеостаза. При этом следует учитывать, что синтез высокомолекулярных белков внеклеточного матрикса и их посттрансляционные модификации требуют высокой активности митохондрий, эндоплазматической сети и аппарата Гольджи, которая также может отражать функциональное состояние ЭК. Вероятнее всего, высокая синтетическая активность ЭК также сопровождается повышенным выделением внеклеточных везикул, опосредующих паракринные эффекты ЭК наряду с выделяемыми в виде свободных молекул цитокинами. Определенную ценность также представляет сравнительный анализ экспрессии маркеров эндотелиальной дифференцировки, более низкий уровень которых может свидетельствовать о нарушениях эндотелиального гомеостаза.

Заключение

Первичные артериальные ЭК экспрессируют около 40 провоспалительных цитокинов, однако их детекция в культуральной среде требует ее предварительного концентрирования (обогащения). Из 40 экспрессируемых в артериальных ЭК генов цитокинов наибольшей базальной экспрессией ($TPM_{Ctrl} >$

2,5) характеризуются гены *MIF*, *CCL2*, *PTX3*, *IL32*, *CXCL1*, *TGFB1*, *LTB*, *CXCL8*, *CSF1*, *CCL14*, *TGFB2*, *IL33*, *CXCL16*, *CXCL2*, *IL1A*, *CSF3*, *IL6*, *IL17D*, *CXCL3*, *CXCL6*, *IL12A*, *CXCL5*, *TGFB3* и *CXCL12*, при этом 11 генов (*CSF2*, *CCL5*, *CCL20*, *CXCL5*, *CXCL8*, *CXCL3*, *CXCL11*, *IL1A*, *CXCL6*, *CXCL2* и *LTB*) обладают высокой кратностью изменения экспрессии (> 4) и $TPM_{Dysf} > 5$, что делает данные молекулы приоритетными при конструировании панелей антител для детекции провоспалительной активации эндотелия. Из генов рецепторных молекул клеточной адгезии лишь 3 (*VCAM1*, *ICAM1* и *SELE*) обладали кратностью изменения экспрессии > 2 и $TPM_{Ctrl} > 2,5$, что делает нецелесообразным использование других молекул клеточной адгезии для анализа провоспалительной активации ЭК. В сравнении с ЭК-ВГА ЭК-КА обладали значительно более выраженной провоспалительной активностью (выражаемой в виде повышенной транскрипции провоспалительных генов *MIF*, *IL6*, *CCL5*, *CSF3*, *CXCL1* и *SELP*), что объясняет повышенную восприимчивость КА к развитию атеросклероза.

Конфликт интересов

В.Е. Маркова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Д.К. Шишкова заявляет об отсутствии

конфликта интересов. А.Д. Степанов заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Фролов заявляет об отсутствии конфликта интересов. М.Ю. Синицкий заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Синицкая заявляет об отсутствии конфликта интересов. М.Р. Кабилов заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Е. Тупикин заявляет об отсутствии конфликта интересов. Ю.О. Юрьева заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.И. Лазебная заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Г. Кутихин входит в редакционную коллегию журнала «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний».

Финансирование

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-65-00039 «Идентификация циркулирующего маркера провоспалительной дисфункции эндотелия в контексте гетерогенности эндотелиальных клеток», <https://rscf.ru/project/24-65-00039/>.

Благодарности

Полнотранскриптомное секвенирование было проведено на оборудовании Центра коллективного пользования «Геномика» ИХБФМ СО РАН.

Информация об авторах

Маркова Виктория Евгеньевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-6652-5745

Шишкова Дарья Кирилловна, кандидат биологических наук заведующая лабораторией молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1518-3888

Степанов Александр Денисович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0009-0009-7947-5917

Фролов Алексей Витальевич, доктор медицинских наук старший научный сотрудник лаборатории рентгенэндоваскулярной и реконструктивной хирургии сердца и сосудов отдела хирургии сердца и сосудов федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1746-8895

Синицкий Максим Юрьевич, кандидат биологических наук заведующий лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной медицины федерального

Author Information Form

Markova Victoria E., MSc, Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-6652-5745

Shishkova Daria K., PhD, Head of the Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1518-3888

Stepanov Alexander D., BSc, Junior Researcher, Laboratory of Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0009-0009-7947-5917

Frolov Alexey V., MD, DSc, Senior Researcher, Laboratory for Endovascular and Reconstructive Cardiovascular Surgery, Department of Cardiovascular Surgery, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1746-8895

Sinitzky Maxim Yu., PhD, Head of the Laboratory for Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution "Research Institute

государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-4824-2418

Синицкая Анна Викторовна, кандидат биологических наук старший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-4467-8732

Кабилев Марсель Расимович, руководитель центра коллективного пользования «Геномика» федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-2777-0833

Тупикин Алексей Евгеньевич, научный сотрудник центра коллективного пользования «Геномика» федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-8194-0322

Юрьева Юлия Олеговна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0009-0007-6734-3787

Лазебная Анастасия Ивановна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1867-6354

Кутихин Антон Геннадьевич, доктор медицинских наук заведующий отделом экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Кемерово, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4824-2418

Sinitskaya Anna V., PhD, Senior Researcher, Laboratory for Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Кемерово, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4467-8732

Kabilov Marsel R., Head of the Genomics Core Facility, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-2777-0833

Tupikin Alexey E., Research Fellow, Genomics Core Facility, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-8194-0322

Yurieva Yulia O., Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Кемерово, Russian Federation; **ORCID** 0009-0007-6734-3787

Lazebnaya Anastasia I., Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Кемерово, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1867-6354

Kutikhin Anton G., MD, DSc, Head of the Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Кемерово, Russian Federation; Кемерово, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

Вклад авторов в статью

МВЕ – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение, анализ и интерпретация данных, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ШДК – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение, анализ и интерпретация данных, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

САД – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение, анализ и интерпретация данных, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ФАВ – вклад в концепцию и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

СМЮ – получение, анализ и интерпретация данных, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

MVE – contribution to the concept and design of the study, data collection, analysis and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

HSDK – contribution to the concept and design of the study, data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

SAD – contribution to the concept and design of the study, data collection, analysis and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

FAV – contribution to the concept and design of the study, data analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

SMYu – data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

CAB – получение, анализ и интерпретация данных, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

KMP – получение, анализ и интерпретация данных, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

TAE – получение, анализ и интерпретация данных, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ЮЮО – получение, анализ и интерпретация данных, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ЛАИ – получение, анализ и интерпретация данных, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

КАГ – вклад в концепцию и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

SAV – data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

KMR – data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

TAE – data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

YuYuO – data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

LAI – data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

KAG – contribution to the concept and design of the study, data analysis and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016;248:97-109. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.

2. Amersfoort J, Eelen G, Carmeliet P. Immunomodulation by endothelial cells - partnering up with the immune system? *Nat Rev Immunol*. 2022; 22(9):576-588. doi: 10.1038/s41577-022-00694-4.

3. Trimm E, Red-Horse K. Vascular endothelial cell development and diversity. *Nat Rev Cardiol*. 2023; 20(3):197-210. doi: 10.1038/s41569-022-00770-1.

4. Kutikhin AG, Shishkova DK, Velikanova EA, Sinitsky MY, Sinitskaya AV, Markova VE. Endothelial Dysfunction in the Context of Blood-Brain Barrier Modeling. *J Evol Biochem Physiol*. 2022; 58(3):781-806. doi: 10.1134/S0022093022030139.

5. Goncharov NV, Popova PI, Kudryavtsev IV, Golovkin AS, Savitskaya IV, Avdonin PP, Korf EA, Voitenko NG, Belinskaia DA, Serebryakova MK, Matveeva NV, Gerlakh NO, Anikievich NE, Gubatenko MA, Dobrylko IA, Trulioff AS, Aquino AD, Jenkins RO, Avdonin PV. Immunological Profile and Markers of Endothelial Dysfunction in Elderly Patients with Cognitive Impairments. *Int J Mol Sci*. 2024; 25(3):1888. doi: 10.3390/ijms25031888.

6. Corban MT., Prasad A, Nesbitt L, Loeffler D, Herrmann J, Lerman LO, Lerman A. Local Production of Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor and Plasminogen Activator Inhibitor-1 in the Coronary Circulation Is Associated With Coronary Endothelial Dysfunction in Humans. *J Am Heart Assoc*. 2018; 7(15):e009881. doi: 10.1161/JAHA.118.009881.

7. Shishkova D, Markova V, Markova Y, Sinitsky M, Sinitskaya A, Matveeva V, Torgunakova E, Lazebnaya A, Stepanov A, Kutikhin A. Physiological Concentrations of Calcioprotein Particles Trigger Activation and Pro-Inflammatory Response in Endothelial Cells and Monocytes. *Biochemistry (Mosc)*. 2025; 90(1):132-160. doi: 10.1134/S0006297924604064.

8. Stepanov A, Shishkova D, Markova V, Markova Y, Frolov A, Lazebnaya A, Oshchepkova K, Perepletchikova D, Smirnova D, Basovich L, Repkin E, Kutikhin A. Proteomic Profiling of Endothelial Cell Secretomes After Exposure to Calcioprotein

Particles Reveals Downregulation of Basement Membrane Assembly and Increased Release of Soluble CD59. *Int J Mol Sci*. 2024; 25(21):11382. doi: 10.3390/ijms252111382.

9. Gomez Toledo A, Golden GJ, Cummings RD, Malmström J, Esko JD. Endothelial Glycocalyx Turnover in Vascular Health and Disease: Rethinking Endothelial Dysfunction. *Annu Rev Biochem*. 2025; 94(1):561-586. doi: 10.1146/annurev-biochem-032620-104745.

10. Frolov A, Lobov A, Kabilov M, Zainullina B, Tupikin A, Shishkova D, Markova V, Sinitskaya A, Grigoriev E, Markova Y, Kutikhin A. Multi-Omics Profiling of Human Endothelial Cells from the Coronary Artery and Internal Thoracic Artery Reveals Molecular but Not Functional Heterogeneity. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(19):15032. doi: 10.3390/ijms241915032.

11. Shishkova D, Lobov A, Zainullina B, Matveeva V, Markova V, Sinitskaya A, Velikanova E, Sinitsky M, Kanonykina A, Dyleva Y, Kutikhin A. Calcioprotein Particles Cause Physiologically Significant Pro-Inflammatory Response in Endothelial Cells and Systemic Circulation. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(23):14941. doi: 10.3390/ijms232314941.

12. Sinitsky M, Repkin E, Sinitskaya A, Markova V, Shishkova D, Barbarash O. Proteomic Profiling of Endothelial Cells Exposed to Mitomycin C: Key Proteins and Pathways Underlying Genotoxic Stress-Induced Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2024; 25(7):4044. doi: 10.3390/ijms25074044.

13. Baaten CCFMJ, Vondenhoff S, Noels H. Endothelial Cell Dysfunction and Increased Cardiovascular Risk in Patients With Chronic Kidney Disease. *Circ Res*. 2023; 132(8):970-992. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.123.321752.

14. Segers VFM, Bringmans T, De Keulenaer GW. Endothelial dysfunction at the cellular level in three dimensions: severity, acuteness, and distribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2023; 325(2):H398-H413. doi: 10.1152/ajpheart.00256.2023.

15. Guzik TJ, Nosalski R, Maffia P, Drummond GR. Immune and inflammatory mechanisms in hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2024; 21(6):396-416. doi: 10.1038/s41569-023-00964-1.

Для цитирования: Маркова В.Е., Шишкова Д.К., Степанов А.Д., Фролов А.В., Сеницкий М.Ю., Сеницкая А.В., Кабилов М.Р., Тупикин А.Е., Юрьева Ю.О., Лазебная А.И., Кутихин А.Г. Сравнительный анализ экспрессии провоспалительных цитокинов в первичных эндотелиальных клетках коронарной и внутренней грудной артерии человека. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2025;14(5): 103-121. DOI: 10.17802/2306-1278-2025-14-5-103-121

To cite: Markova V.E., Shishkova D.K., Stepanov A.D., Frolov A.V., Kabilov M.R., Tupikin A.E., Sinitsky M.Yu., Sinitskaya A.V., Yurieva Yu.O., Lazebnaya A.I., Kutikhin A.G. Expression of pro-inflammatory cytokines in primary human coronary artery and internal thoracic artery endothelial cells. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2025;14(5): 103-121. DOI: 10.17802/2306-1278-2025-14-5-103-121